



**PENGARUH KONSENTRASI ZAT PENGATUR TUMBUH
2,4-DIKLOROFENOKSIASETAT
TERHADAP PERTUMBUHAN KALUS
BIJI MAHKOTA DEWA (*Phaleria macrocarpa* (Scheff). Boerl)**

**NUR IHSANI YUSUF
N111 05 044**



Tgl. Pengisian	2 - 12 - 09
Aspek	farmasi
Dasar	1 dis
Halaman	Kuliah
No. Inventaris	52
No. Pendaftar	SKR - F09

YUS
P

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

**PENGARUH KONSENTRASI ZAT PENGATUR TUMBUH
2,4-DIKLOROFENOKSIASETAT
TERHADAP KECEPATAN PERTUMBUHAN KALUS
BIJI MAHKOTA DEWA (*Phaleria macrocarpa* (Scheff). Boerl)**

SKRIPSI

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

**NUR IHSANI YUSUF
N111 05 044**

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



PENGARUH KONSENTRASI ZAT PENGATUR TUMBUH
2,4-DIKLOROFENOKSIASETAT
TERHADAP PERTUMBUHAN KALUS
BIJI MAHKOTA DEWA (*Phaleria macrocarpa* (Scheff). Boerl)

NUR IHSANI YUSUF

N111 05 044

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. 131862603

Pada Tanggal 25 Nopember 2009



UCAPAN TERIMA KASIH

Alhamdulillah, tiada kata yang lebih patut diucapkan oleh seorang hamba yang beriman selain ucapan puji syukur ke hadirat Allah swt, Tuhan Yang Maha Mengetahui, Pemilik segala ilmu, karena atas petunjuk-Nya maka skripsi ini dapat diselesaikan.

Sungguh banyak kendala yang penulis hadapi dalam rangka penyusunan skripsi ini, sejak dari merencanakan penelitian hingga penyusunan laporannya. Namun berkat dukungan dan bantuan berbagai pihak, akhirnya penulis dapat melewati kendala-kendala tersebut. Oleh karena itu, penulis dengan tulus menghaturkan banyak terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya 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 atas waktu dan tenaga yang diluangkan oleh beliau dalam memberikan arahan dan bimbingan kepada penulis dalam menyusun skripsi ini.

Demikian pula penulis menyampaikan terima kasih kepada Dekan Fakultas Farmasi UNHAS beserta seluruh staf atas segala fasilitas yang diberikan selama penulis menempuh studi hingga menyelesaikan penelitian ini. Juga kepada kepala Laboratorium Bioteknologi Pertanian PKP UNHAS beserta seluruh staf yang telah mengizinkan kami melakukan penelitian di laboratorium tersebut.

Terkhusus lagi kepada teman-teman seperjuangan, Asty, Asih, Mimi, Tanti, Mahfiah dan seluruh Gallenica crew atas kebersamaannya dalam menghadapi suka duka dan pahit getirnya menempuh pendidikan di fakultas Farmasi yang tercinta ini.

Dan semua ini tiada artinya tanpa dukungan moril dari kedua orang tua tercinta, Ayahanda Drs.H.M Yusuf Husain dan Ibunda Nadirah, serta saudara-saudaraku tersayang, Kanda Yunarti, Kanda Saifuddin (almarhum), Kanda Alauddin dan Kanda Arafah, yang semuanya telah memberikan dukungan dan dorongan moril dan materil yang tak terhitung bagi penulis, yang tidak mungkin penulis balas dengan tunai.

Akhirnya semoga karya kecil ini dapat bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan. Amin

Makassar, Nopember 2009

Nur Ihsani Yusuf

ABSTRAK

Penelitian tentang pengaruh konsentrasi zat pengatur tumbuh 2,4-D terhadap pertumbuhan kalus biji mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*. (Scheff). Boerl) telah dilakukan. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh konsentrasi zat pengatur tumbuh 2,4-D yang optimum untuk pertumbuhan kalus biji mahkota dewa. Selanjutnya kandungan kimia dari kalus yang terbentuk dibandingkan dengan tanaman aslinya. Eksplan ditumbuhkan pada media *Murashige Skoog* (MS) yang ditambahkan zat pengatur tumbuh 2,4-D dalam tiga konsentrasi yang berbeda: 1, 3 dan 5 mg/l. Pengamatan pertumbuhan kalus dilakukan hingga 1 bulan setelah subkultur kedua. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa media MS dengan konsentrasi 2,4-D 5 mg/l dapat memberikan pertumbuhan optimum pada kalus biji mahkota dewa. Kalus biji mahkota dewa dan tanaman asli mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*. (Scheff). Boerl) memiliki kesamaan profil KLT.

Kata kunci : Mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*. (Scheff). Boerl), kultur kalus, 2,4-diklorofenoksiasetat.

ABSTRACT

An investigation concerning the effect of growth regulator concentration to the formation of *Phaleria macrocarpa* (Scheff). Boerl seed callus in tissue culture has been conducted. The research was aimed to know the optimum concentration of growth regulator to the formation of *Phaleria macrocarpa* (Scheff). Boerl seed callus in tissue culture. More over the chemical content of formed callus was also compared with origin plant. *Phaleria macrocarpa* (Scheff). Boerl seed were cultivated in *Murashige Skoog* (MS) medium that supplemented with 2,4-dichlorophenoxyacetic in three concentration; 1, 3 and 5 mg/L. Observation of callus formation was done until 1 month after second subculture. The result showed that concentration of 5 mg/L 2,4-D gave an optimum callus formation. There were a similar Thin Layer Chromatography profile between callus extract and origin plant.

Key word: mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff). Boerl), callus culture, 2,4-dichlorophenoxyacetic.

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	5
II.2 Uraian Kultur Jaringan Tanaman.....	6
II.2.1 Media Tanam.....	8
II.2.2 Zat pengatur tumbuh.....	14
II.2.3 Sterilisasi.....	17
II.2.4 Kultur Kalus.....	21
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.....	28
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.....	36
V.1Kesimpulan.....	36
V.2 Saran.....	36
DAFTAR PUSTAKA.....	37
LAMPIRAN.....	39

DAFTAR TABEL

Tabel	halaman
1. Data Pertambahan Bobot Kalus (g) Dengan Konsentrasi 1 mg/l 2,4-Diklorofenoksiasetat.....	44
2. Data Pertambahan Bobot Kalus (g) Dengan Konsentrasi 3 mg/l 2,4-Diklorofenoksiasetat.....	44
3. Data Pertambahan Bobot Kalus (g) Dengan Konsentrasi 5 mg/l 2,4-Diklorofenoksiasetat.....	45
4. Daftar nilai Rf.....	46

DAFTAR GAMBAR

Gambar	halaman
1. Kurva pertambahan bobot kalus pada awal penanaman	47
2. Kurva pertambahan bobot kalus pada subkultur I.....	47
3. Kurva pertambahan bobot kalus pada subkultur II.....	48
4. Kurva hubungan konsenytrasi 2,4-D terhadap bobot basah dan kering kalus mahkota dewa.....	48
5. Gambar eksplan pada awal penanaman.....	49
6. Gambar eksplan berumur satu bulan setelah penanaman.....	50
7. Gambar eksplan berumur satu bulan setelah subkultur I.....	51
8. Gambar eksplan berumur satu bulan setelah subkultur II.....	52
9. Profil KLT dengan pembanding (P) ekstrak metanol kulit buah mahkota dewa dan sampel (5mg/L) ekstrak kalus biji mahkota dewa dengan eluen etil asetat 100 %.....	53
10. Profil KLT dengan pembanding (P) ekstrak methanol kulit buah mahkota dewa dan sampel (5mg/L) ekstrak kalus biji mahkota dewa dengan eluen etil asetat 100 %.....	53
11. Profil KLT dengan pembanding (P) ekstrak methanol kulit buah mahkota dewa dan sampel (5mg/L) ekstrak kalus biji mahkota dewa dengan eluen etil asetat 100 %.....	54
12. Sampel tanaman mahkota dewa (<i>Phaleria macrocarpa</i>).....	55

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	halaman
1. Komposisi Media MS (Murashige and Skoog).....	39
2. Skema Kerja Pembuatan Media MS (Murashige and Skoog)..	41
3. Skema Kerja Penanaman Eksplan Biji Mahkota Dewa.....	42
4. Klasifikasi tanaman <i>Phaleria macrocarpa</i> (Scheff.) Boerl....	43

BAB I

PENDAHULUAN

Mahkota dewa adalah tanaman asli Indonesia. Dalam daun dan kulit buahnya terkandung alkaloid, saponin, dan flavanoid. Selain itu, di dalam daunnya juga terkandung polifenol. Beberapa penyakit berat (seperti sakit lever, kanker, sakit jantung, asam urat, reumatik, tekanan darah tinggi dan lain-lain) dan penyakit ringan (seperti eksim, jerawat, dan luka gigitan serangga) bisa disembuhkan dengan tanaman mahkota dewa.

(1)

Suplai buah mahkota dewa sampai saat ini masih sangat terbatas. Kebutuhan akan mahkota dewa sebagai obat menunjukkan peningkatan. Hal ini tercermin dari harganya yang cukup tinggi. (2)

Tanaman banyak yang menghasilkan senyawa tertentu hasil metabolisme sekunder yang disebut metabolit sekunder, seperti lesitin pada kedelai, solanin dan solasidin pada kentang, atau alisin pada bawang. Senyawa metabolit sekunder seringkali bernilai komersial dan perlu diperbanyak secara besar-besaran. Untuk memproduksi senyawa sekunder dapat dilakukan dengan mengeksploitasi sel agar berfungsi sebagai pabrik pembuat senyawa sekunder secara terus menerus, seperti yang telah banyak dilakukan untuk memproduksi shikonin (pigmen), berberine (obat) dan ginseng (obat). (3)

Kultur jaringan tumbuhan merupakan suatu teknik dalam pertumbuhan sel, jaringan dan organ tumbuhan di dalam media yang

berisi nutrisi dan ketidakhadiran mikroorganisme. Jaringan dapat dikulturkan pada agar padat atau dalam media hara cair. Jika ditanam dalam agar, jaringan akan membentuk kalus, yaitu massa atau sel-sel yang tak tertata. Dalam budidaya *in vitro* atau budidaya kultur jaringan, menginduksi terbentuknya kalus merupakan salah satu langkah yang penting. Setelah itu diusahakan merangsang agar terjadi diferensiasi, terjadi akar dan tunas. (4, 5, 6)

Keberhasilan kultur jaringan tanaman dalam perbanyakan tanaman sangat dipengaruhi oleh keadaan media kultur yang digunakan. Media yang digunakan dalam kultur jaringan tanaman terdiri dari beberapa komponen : garam-garam mineral, vitamin, asam amino, hormon pertumbuhan, sukrosa, agar atau gelrite dan air. Semua bahan tersebut memenuhi satu atau lebih fungsi dalam pertumbuhan tanaman secara *in vitro*. Zat tambahan yang biasa digunakan adalah zat pengatur tumbuh. Zat pengatur tumbuh auksin (Indol Asam Asetat, Indol Asam Butirat, Naftalen Asam Asetat, dan 2,4 diklorfenoksiasetat) dan sitokinin (Kinetin, Zeatin, dan BAP) dapat diberikan bersama-sama atau tunggal, tergantung tujuan kita, misalnya untuk menginduksi kalus saja atau ingin menumbuhkan akarnya atau tunasnya dahulu atau kedua-duanya. Baik auksin dan atau sitokinin ditambahkan kedalam media untuk meningkatkan perkembangan sel dan atau pembagian sel yang tergantung dari tipe eksplan dan jenis tanaman yang digunakan. (7, 8, 9, 10)

Hormon 2,4-Diklorofenoksiasetat (2,4-D) merupakan auksin yang lebih sering digunakan untuk induksi kalus. Namun media yang mengandung 2,4-D dengan konsentrasi berlebih menyebabkan kalus akan membentuk tunas dan akar. 2,4-D menunjukkan aktivitas auksin yang lebih tinggi dan stabil terhadap pemanasan oleh proses sterilisasi. Untuk inisiasi pembentukan kalus pada beberapa eksplan diperlukan kurang dari 0,1 mg/l, meskipun pada beberapa tanaman kultur jaringan yang lain membutuhkan 5-10 mg/l untuk merangsang pembelahan sel. (7, 11, 12)

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh konsentrasi 2,4-D sebagai hormon tumbuh terhadap pertumbuhan kalus biji mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff). Boerl). Selain itu melihat profil KLT dari ekstrak kalus yang diperoleh sehingga dapat diketahui senyawa atau kandungan kimia yang terkandung didalamnya.

Hasil penelitian diharapkan dapat memberikan informasi kepada masyarakat bahwa mahkota dewa dapat dikembangkan dengan menggunakan teknik kultur jaringan tumbuhan, informasi tentang variasi konsentrasi hormon tumbuh 2,4 D yang optimal pertumbuhan kalus.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Uraian Tanaman Mahkota Dewa

II.1.1 Klasifikasi

Divisi	: Spermathophyta
Subdivisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledoneae
Bangsa	: Thymelaeales
Suku	: Thymelaeaceae
Marga	: Phaleria
Spesies	: <i>Phaleria macrocarpa</i> (Scheff.) Boerl. (1)

II.1.2 Morfologi

Mahkota dewa merupakan tanaman perdu. Dalam pertumbuhannya, mahkota dewa ini dapat mencapai ketinggian 1-2,5 meter. Morfologi tanaman ini cukup sempurna karena memiliki batang, daun, bunga, dan buah.

Daun mahkota dewa merupakan daun tunggal. Bentuknya lonjong atau lanset. Wamanya hijau. Permukaannya licin dan tidak berbulu. Pertumbuhannya lebat. Panjangnya bisa mencapai 7-10 cm, dengan lebar 3-5 cm. Pertulangan daunnya menyirip.

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 kira-kira sebesar bunga tanaman cengkeh. Bunga ini biasanya paling banyak muncul pada saat musim penghujan.

Buah mahkota dewa merupakan ciri khas tanaman mahkota dewa. Bentuknya bulat, seperti bola. Ukurannya bervariasi. Saat masih muda, kulitnya berwarna hijau. Namun, saat sudah tua, warnanya berubah menjadi merah marun. Ketebalan kulit sekitar 0,5-1 mm. Daging buah berwarna putih.

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. Akar mahkota dewa termasuk akar tunggang. Penyebaran akarnya ke samping. Panjang akarnya bisa mencapai 100 cm. Mahkota dewa memiliki batang yang bulat dengan permukaan batang yang kasar. Kulitnya berwarna cokelat kehijauan, sedangkan kayunya berwarna putih. Batang mahkota dewa bergetah dan biasanya memiliki cukup banyak batang. (1)

II.1.3 Kandungan Kimia

Penelitian tentang uji aktivitas dan karakterisasi senyawa aktif terus dikembangkan, terutama aktivitasnya sebagai antioksidan yang merupakan senyawa polifenol, flavonoid, alkaloid, dan saponin. Salah satu senyawa aktif yang ditemukan terdapat dalam ekstrak metanol daging

ketiak daun. Warnanya putih. Bentuknya seperti terompet kecil. Baunya harum. Ukurannya kira-kira sebesar bunga tanaman cengkeh. Bunga ini biasanya paling banyak muncul pada saat musim penghujan.

Buah mahkota dewa merupakan ciri khas tanaman mahkota dewa. Bentuknya bulat, seperti bola. Ukurannya bervariasi. Saat masih muda, kulitnya berwarna hijau. Namun, saat sudah tua, warnanya berubah menjadi merah marun. Ketebalan kulit sekitar 0,5-1 mm. Daging buah berwarna putih.

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. Akar mahkota dewa termasuk akar tunggang. Penyebaran akarnya ke samping. Panjang akarnya bisa mencapai 100 cm. Mahkota dewa memiliki batang yang bulat dengan permukaan batang yang kasar. Kulitnya berwarna coklat kehijauan, sedangkan kayunya berwarna putih. Batang mahkota dewa bergetah dan biasanya memiliki cukup banyak batang. (1)

II.1.3 Kandungan Kimia

Penelitian tentang uji aktivitas dan karakterisasi senyawa aktif terus dikembangkan, terutama aktivitasnya sebagai antioksidan yang merupakan senyawa polifenol, flavonoid, alkaloid, dan saponin. Salah satu senyawa aktif yang ditemukan terdapat dalam ekstrak metanol daging

buahnya yang merupakan senyawa flavonoid. Sebagai lanjutan penelitian studi kimia dari bagian buah mahkota dewa, telah diisolasi senyawa antioksidan benzofenon glikosida dari ekstrak *n*-butanol. (13,14)

II.2 Uraian Kultur Jaringan Tanaman

Perbanyakan tanaman dapat digolongkan menjadi dua, yaitu perbanyakan tanaman secara generatif dan perbanyakan tanaman secara vegetatif. Perbanyakan tanaman secara generatif adalah dengan menanam biji, sedangkan perbanyakan tanaman secara vegetatif dapat dilakukan dengan cara stek, okulasi, penyambungan, merunduk, dan yang paling mutakhir adalah dengan kultur jaringan. 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 sifatnya sama dengan induknya. (9)

Teori sel dari Schwann dan Schleiden mendeskripsikan sel sebagai unit biologi terkecil yang mempunyai kemampuan **totipotensi** untuk menunjang kultur jaringan, sehingga satu sel hidup dapat berkembang menjadi suatu tumbuhan lengkap, bila dikondisikan pada lingkungan yang sesuai. (15)

Kegunaan utama dari kultur jaringan adalah untuk mendapatkan tanaman baru dalam waktu yang relatif singkat, yang mempunyai sifat fisiologi dan morfologi sama persis dengan tanaman induknya. Dari teknik kultur jaringan ini diharapkan pula memperoleh tanaman baru yang bersifat unggul.



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 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. (9)

II.2.1 Media Tanam

Pertumbuhan dan perkembangan tanaman secara *in vitro* ditentukan oleh beberapa faktor :

1. Faktor genetik dari tanaman itu sendiri.
2. Nutrisi : air, makro dan mikro elemen, dan gula.
3. Faktor fisik: cahaya, suhu, pH, kadar oksigen dan karbondioksida.
4. Beberapa bahan organik : zat pengatur tumbuh, vitamin dan lain-lain.

(10)

Keberhasilan dalam teknologi serta penggunaan metode *in vitro* terutama disebabkan pengetahuan yang baik tentang kebutuhan hara dari sel dan jaringan yang dikulturkan. Hara terdiri dari komponen yang utama dan komponen tambahan. (5)

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 17 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 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

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

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 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

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-binti 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 $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Di dalam kultur jaringan, pemberian unsur Fe juga berfungsi sebagai penyangga (chelating agent) yang sangat penting untuk menyangga kestabilan pH media selama digunakan untuk menumbuhkan jaringan tanaman. Pada tanaman, unsur Fe berfungsi untuk pernapasan dan pembentukan hijau daun. (9)

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.

Sukrosa sering ditambahkan pada media kultur jaringan sebagai sumber energy yang diperlukan untuk induksi kalus. Sukrosa dengan konsentrasi 2%-5% merupakan sumber karbon. Penggunaan sukrosa di atas kadar 3% menyebabkan terjadinya penebalan dinding sel. Glukosa dan fruktosa dapat digunakan untuk mengganti sukrosa karena dapat merangsang pertumbuhan beberapa jaringan.

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

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

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.

Sukrosa sering ditambahkan pada media kultur jaringan sebagai sumber energy yang diperlukan untuk induksi kalus. Sukrosa dengan konsentrasi 2%-5% merupakan sumber karbon. Penggunaan sukrosa di atas kadar 3% menyebabkan terjadinya penebalan dinding sel. Glukosa dan fruktosa dapat digunakan untuk mengganti sukrosa karena dapat merangsang pertumbuhan beberapa jaringan.

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

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 biasanya bertujuan untuk mencegah terjadinya pencoklatan pada permukaan irisan jaringan.

Asam-asam amino berperan penting untuk pertumbuhan dan diferensiasi kalus. Asparagin dan glutamin berperan dalam metabolisme asam amino, karena dapat menjadi pembawa dan sumber amonia untuk sintesis asam-asam amino baru dalam jaringan.

Zat pengatur tumbuh pada tanaman adalah senyawa organik bukan hara, yang dalam jumlah sedikit dapat mendukung, menghambat dan dapat merubah proses fisiologi tumbuhan. Zat pengatur tumbuh dalam tanaman terdiri dari lima kelompok yaitu auksin, giberelin, sitokinin, etilen dan inhibitor dengan ciri khas serta pengaruh yang berlainan terhadap proses fisiologis.

Media tanam harus berisi semua zat yang diperlukan untuk menjamin pertumbuhan eksplan. Bahan-bahan yang diramu berisi campuran garam mineral sumber unsur makro dan unsur mikro, gula, protein, vitamin dan hormon tumbuh. Dengan demikian keberhasilan kultur jaringan jelas ditentukan oleh media tanam dan macam tanaman. Media tanam kultur jaringan adalah tempat untuk tumbuh eksplan. 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 pematid agar.

prekursor dari beberapa alkaloid. Pemberian vitamin C biasanya bertujuan untuk mencegah terjadinya pencoklatan pada permukaan irisan jaringan.

Asam-asam amino berperan penting untuk pertumbuhan dan diferensiasi kalus. Asparagin dan glutamin berperan dalam metabolisme asam amino, karena dapat menjadi pembawa dan sumber amonia untuk sintesis asam-asam amino baru dalam jaringan.

Zat pengatur tumbuh pada tanaman adalah senyawa organik bukan hara, yang dalam jumlah sedikit dapat mendukung, menghambat dan dapat merubah proses fisiologi tumbuhan. Zat pengatur tumbuh dalam tanaman terdiri dari lima kelompok yaitu auksin, giberelin, sitokinin, etilen dan inhibitor dengan ciri khas serta pengaruh yang berlainan terhadap proses fisiologis.

Media tanam harus berisi semua zat yang diperlukan untuk menjamin pertumbuhan eksplan. Bahan-bahan yang diramu berisi campuran garam mineral sumber unsur makro dan unsur mikro, gula, protein, vitamin dan hormon tumbuh. Dengan demikian keberhasilan kultur jaringan jelas ditentukan oleh media tanam dan macam tanaman. Media tanam kultur jaringan adalah tempat untuk tumbuh eksplan. 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 pematid agar.

Zat pematat yang digunakan untuk membuat media padat adalah berupa agar-agar yang dijual dalam kemasan. Akan tetapi banyak pula yang menggunakan agar batangan karena harganya relatif lebih murah. Penggunaan agar biasanya adalah 8-10 g/liter air suling. (9)

Agar dihasilkan dari rumput laut, yang dapat digunakan sebagai bahan pematat pada kebanyakan media. Walaupun merupakan produk tanaman, agar dimurnikan melalui prosedur pengolahan jadi hampir tidak terdapat produk beracun di dalamnya. Agar adalah polisakarida dengan bobot molekul yang tinggi yang memiliki kemampuan memadatkan media. Agar yang terlarut membentuk gel yang dapat mengikat air (makin tinggi konsentrasi agar, makin kuat pengikatan air). (10)

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. (11)

Media MS (*Murashige dan Skoog*) adalah media yang paling banyak digunakan dalam kultur jaringan dan telah dikembangkan dengan berbagai variasi. Karena mengandung konsentrasi mineral yang tinggi, media MS adalah media yang kaya akan garam-garam dan tidak sesuai untuk tanaman tertentu. Untuk mencegah hal itu, media MS sering digunakan dengan konsentrasi mikroelemen yang sebenarnya, tetapi

dengan konsentrasi makroelemen setengah atau sepertiga dari konsentrasi yang seharusnya diberikan. (8)

Untuk membuat media kultur jaringan, biasanya menimbang setiap komponen bahan kimia yang terdapat pada resep media dasar. Langkah ini kurang praktis karena memakan banyak waktu dan mengurangi ketepatan. Selain itu, timbangan yang digunakan untuk menimbang sejumlah kecil bahan kimia kadang-kadang tidak tersedia. Kendala ini dapat diatasi dengan membuat larutan stok terlebih dahulu. Larutan stok dapat digunakan untuk 40, 50 bahkan 100 liter media. Larutan stok dalam bentuk cairan disimpan dalam lemari es. Jika terjadi pengendapan, maka sebelum digunakan terlebih dahulu harus dipanaskan. Sebaiknya larutan stok dibuat dalam jumlah yang tidak terlalu banyak dan faktor kebersihan tempat penyimpanan harus benar-benar dijaga. (9)

II.2.2 Zat pengatur tumbuh

Kebanyakan ahli fisiologi tumbuhan mempergunakan istilah zat pengatur tumbuh tanaman daripada istilah hormon tanaman. Karena istilah tersebut dapat mencakup baik zat-zat endogen maupun zat eksogen (sintetik) yang dapat mengubah pertumbuhan tanaman. Hormon tanaman dapat didefinisikan sebagai senyawa organik bukan nutrisi yang aktif dalam jumlah yang kecil yang disintesis pada bagian tertentu dan pada umumnya diangkut ke bagian lain tanaman dimana zat tersebut menimbulkan tanggapan secara biokimia, fisiologis dan morfologis. (12)

Ada beberapa golongan senyawa yang dikenal memiliki efek pengaturan yang berbeda dalam pertumbuhan dan perkembangan tanaman, Ada auksin, sitokinin, giberelin, asam absisik, 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. (4)

1. Auksin

Golongan auksin yang sering digunakan adalah NAA, 2,4-D, IAA, CPA dan IBA. IAA merupakan auksin alam tetapi relatif kurang stabil dibandingkan dengan NAA dan 2,4-D, karena mudah teroksidasi oleh cahaya ataupun oksidasi enzimatik. (11)

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). (4)

Auksin IAA biasanya ditambahkan pada media dengan konsentrasi 0,01-10 mg/l. Auksin sintetik dan relatif lebih aktif (IBA, NAA dan 2,4-D) biasanya digunakan pada konsentrasi 0.001-10 mg/l. Secara umum, auksin menyebabkan perpanjangan sel dan pembesaran jaringan, pembelahan sel (pembentukan kalus), dan embryogenesis pada kultur suspensi. (10)

2,4-D merupakan auksin yang paling ampuh dibandingkan NAA atau IAA. Untuk inisiasi pembentukan kalus pada beberapa eksplan hanya diperlukan kurang dari 0,1 mg/l, meskipun beberapa kultur jaringan yang lain memerlukan 5-10 mg/l untuk merangsang pembelahan sel. Dibandingkan terhadap IAA, 2,4-D memiliki aktivitas auksin yang lebih tinggi namun kelarutan dalam lemak dan air dari kedua senyawa ini (IAA dan 2,4-D) adalah sama. (11, 12)

2. Sitokinin

Sitokinin yang sering digunakan untuk merangsang pertumbuhan dan perkembangan adalah kinetin, BA, 2iP dan PBA. Sitokinin biasanya digunakan untuk meningkatkan pembelahan sel, khususnya jika ditambahkan dengan auksin. Pada konsentrasi yang tinggi (1-10 mg/l), dapat menginduksi pembentukan tunas. (10)

3. Giberelin

Giberelin yang sering digunakan untuk merangsang pertumbuhan normal tanaman adalah GA_3 . Dibandingkan dengan auksin dan sitokinin, giberelin lebih jarang digunakan. Senyawa ini jarang digunakan pada kultur jaringan tanaman. Setelah diautoklaf, 90% aktivitas biologisnya hilang. (10,11)

II.2.3 Sterilisasi

Menjaga kesterilan merupakan hal dasar yang penting karena semua media yang digunakan mengandung nutrisi yang mendukung pertumbuhan bakteri dan jamur. Bakteri dan jamur dapat segera menguasai dan menghancurkan pertumbuhan jaringan tanaman. Pertumbuhan kontaminan tidak diharapkan karena dapat menghasilkan toksin ataupun merangsang pembentukan toksin yang dapat mempengaruhi pertumbuhan sel tanaman. Untuk alasan ini, organ tanaman harus disterilkan secara kimiawi pada saat akan dilakukan inisiasi, alat-alat, tempat kultur dan media harus disterilkan sebelum digunakan. Semua perlakuan kultur harus dilaksanakan secara aseptik didalam ruang inokulasi yang dirancang khusus. (16)

Metode sterilisasi dibagi menjadi dua, yaitu metode fisik dan metode kimia. Metode sterilisasi kimia dilakukan dengan menggunakan bahan-bahan kimia, sedangkan metode sterilisasi fisik dapat dilakukan dengan cara panas baik panas kering maupun panas basah, radiasi dan filtrasi.

1. Metode sterilisasi fisik

Metode sterilisasi panas merupakan metode yang paling dapat dipercaya dan banyak digunakan. Metode sterilisasi ini digunakan untuk bahan yang tahan panas. Metode sterilisasi panas dengan penggunaan uap air disebut metode sterilisasi panas lembab atau sterilisasi basah. Metode sterilisasi panas tanpa kelembaban (tanpa penggunaan uap air)

disebut metode sterilisasi panas kering atau sterilisasi panas. Sterilisasi panas kering berfungsi untuk mematikan organisme dengan cara mengoksidasi komponen sel ataupun mendenaturasi enzim. Metode ini tidak dapat digunakan untuk bahan yang terbuat dari karet atau plastik, waktu sterilisasinya lama (sekitar 2-3 jam), dan berdaya penetrasi rendah. Sterilisasi panas basah dengan perebusan menggunakan air mendidih 100°C selama 10 menit efektif untuk sel-sel vegetatif dan spora eukariot, namun tidak efektif untuk endospora bakteri. Sterilisasi panas basah menggunakan temperatur di atas 100°C dilakukan dengan uap menggunakan autoklaf. Prinsip autoklaf adalah terjadinya koagulasi yang lebih cepat dalam keadaan basah dibandingkan keadaan kering. Proses sterilisasi dengan autoklaf ini dapat membunuh mikroorganisme dengan cara mendenaturasi atau mengkoagulasi protein pada enzim dan membran sel mikroorganisme. Proses ini juga dapat membunuh endospora bakteri.

Metode sterilisasi dengan penyaringan digunakan untuk bahan yang sensitif terhadap panas, misalnya enzim. Pada proses ini digunakan membran filter yang terbuat dari selulosa asetat. Kerugian prosedur ini adalah biaya yang mahal serta filter yang mudah mampat akibat filtrat tertinggal pada saringan sehingga harus segera diganti. Kerugian yang lain adalah meskipun memiliki pori-pori yang halus, membran filter tidak dapat digunakan untuk menyaring virus.

Metode sterilisasi dengan menggunakan radiasi dilakukan dengan menggunakan sinar UV ataupun dengan metode ionisasi. Sinar UV dengan panjang gelombang 260 nm memiliki daya penetrasi yang rendah sehingga tidak mematikan mikroorganisme namun dapat mempenetrasi gelas, air dan substansi lainnya. Sinar UV bereaksi dengan asam nukleat sel mikroorganisme dan menyebabkan ikatan antara molekul-molekul timin yang bersebelahan dan menyebabkan terbentuknya dimer timin. Dimer timin dapat menghalangi replikasi DNA normal dengan menutup jalan enzim replikasi. Penggunaan sterilisasi dengan sinar UV antara lain untuk sterilisasi kabinet dan ruangan.

Pasteurisasi bukan merupakan suatu bentuk sterilisasi, melainkan merupakan metode untuk membinasakan mikroorganisme patogen.

Pengeringan (desikasi) merupakan metode sterilisasi dengan menghilangkan kandungan air. Karena mikroorganisme harus tumbuh dalam lingkungan yang lembab, maka ketiadaan air dapat menghambat pertumbuhannya. Endospora bakteri sangat tahan terhadap kekeringan, sehingga proses pengeringan (desikasi) ini tidak dapat diaplikasikan pada endospora bakteri.

2. Metode sterilisasi kimia

Metode sterilisasi kimia dilakukan untuk bahan-bahan yang rusak bila disterilkan pada suhu tinggi. Kekuatan agen antimikroba kimiawi diklasifikasikan atas dasar efisiensinya dalam membunuh mikroorganisme.

Metode sterilisasi dengan menggunakan radiasi dilakukan dengan menggunakan sinar UV ataupun dengan metode ionisasi. Sinar UV dengan panjang gelombang 260 nm memiliki daya penetrasi yang rendah sehingga tidak mematikan mikroorganisme namun dapat mempenetrasi gelas, air dan substansi lainnya. Sinar UV bereaksi dengan asam nukleat sel mikroorganisme dan menyebabkan ikatan antara molekul-molekul timin yang bersebelahan dan menyebabkan terbentuknya dimer timin. Dimer timin dapat menghalangi replikasi DNA normal dengan menutup jalan enzim replikasi. Penggunaan sterilisasi dengan sinar UV antara lain untuk sterilisasi kabinet dan ruangan.

Pasteurisasi bukan merupakan suatu bentuk sterilisasi, melainkan merupakan metode untuk membinasakan mikroorganisme patogen.

Pengeringan (desikasi) merupakan metode sterilisasi dengan menghilangkan kandungan air. Karena mikroorganisme harus tumbuh dalam lingkungan yang lembab, maka ketiadaan air dapat menghambat pertumbuhannya. Endospora bakteri sangat tahan terhadap kekeringan, sehingga proses pengeringan (desikasi) ini tidak dapat diaplikasikan pada endospora bakteri.

2. Metode sterilisasi kimia

Metode sterilisasi kimia dilakukan untuk bahan-bahan yang rusak bila disterilkan pada suhu tinggi. Kekuatan agen antimikroba kimiawi diklasifikasikan atas dasar efisiensinya dalam membunuh mikroorganisme.

Metode sterilisasi dengan menggunakan radiasi dilakukan dengan menggunakan sinar UV ataupun dengan metode ionisasi. Sinar UV dengan panjang gelombang 260 nm memiliki daya penetrasi yang rendah sehingga tidak mematikan mikroorganisme namun dapat mempenetrasi gelas, air dan substansi lainnya. Sinar UV bereaksi dengan asam nukleat sel mikroorganisme dan menyebabkan ikatan antara molekul-molekul timin yang bersebelahan dan menyebabkan terbentuknya dimer timin. Dimer timin dapat menghalangi replikasi DNA normal dengan menutup jalan enzim replikasi. Penggunaan sterilisasi dengan sinar UV antara lain untuk sterilisasi kabinet dan ruangan.

Pasteurisasi bukan merupakan suatu bentuk sterilisasi, melainkan merupakan metode untuk membinasakan mikroorganisme patogen.

Pengeringan (desikasi) merupakan metode sterilisasi dengan menghilangkan kandungan air. Karena mikroorganisme harus tumbuh dalam lingkungan yang lembab, maka ketiadaan air dapat menghambat pertumbuhannya. Endospora bakteri sangat tahan terhadap kekeringan, sehingga proses pengeringan (desikasi) ini tidak dapat diaplikasikan pada endospora bakteri.

2. Metode sterilisasi kimia

Metode sterilisasi kimia dilakukan untuk bahan-bahan yang rusak bila disterilkan pada suhu tinggi. Kekuatan agen antimikroba kimiawi diklasifikasikan atas dasar efisiensinya dalam membunuh mikroorganisme.

Metode sterilisasi dengan menggunakan radiasi dilakukan dengan menggunakan sinar UV ataupun dengan metode ionisasi. Sinar UV dengan panjang gelombang 260 nm memiliki daya penetrasi yang rendah sehingga tidak mematikan mikroorganisme namun dapat mempenetrasi gelas, air dan substansi lainnya. Sinar UV bereaksi dengan asam nukleat sel mikroorganisme dan menyebabkan ikatan antara molekul-molekul timin yang bersebelahan dan menyebabkan terbentuknya dimer timin. Dimer timin dapat menghalangi replikasi DNA normal dengan menutup jalan enzim replikasi. Penggunaan sterilisasi dengan sinar UV antara lain untuk sterilisasi kabinet dan ruangan.

Pasteurisasi bukan merupakan suatu bentuk sterilisasi, melainkan merupakan metode untuk membinasakan mikroorganisme patogen.

Pengeringan (desikasi) merupakan metode sterilisasi dengan menghilangkan kandungan air. Karena mikroorganisme harus tumbuh dalam lingkungan yang lembab, maka ketiadaan air dapat menghambat pertumbuhannya. Endospora bakteri sangat tahan terhadap kekeringan, sehingga proses pengeringan (desikasi) ini tidak dapat diaplikasikan pada endospora bakteri.

2. Metode sterilisasi kimia

Metode sterilisasi kimia dilakukan untuk bahan-bahan yang rusak bila disterilkan pada suhu tinggi. Kekuatan agen antimikroba kimiawi diklasifikasikan atas dasar efisiensinya dalam membunuh mikroorganisme.

Metode sterilisasi kimia dapat dilakukan dengan menggunakan gas (dengan cara fumigasi atau pengasapan) atau radiasi. Beberapa bahan kimia yang dapat digunakan untuk sterilisasi gas adalah etilen oksida, gas formaldehid, asam parasetat dan glutaraldehid alkalin. Sterilisasi kimia juga dapat dilakukan dengan penggunaan cairan desinfektan berupa senyawa aldehid, hipoklorit, fenolik dan alkohol.

Klorin (chlorine, Cl_2) sebagai gas ataupun dalam kombinasi dengan bahan kimia yang lain (natrium hipoklorit atau kalsium hipoklorit) adalah desinfektan yang digunakan secara luas. Kemampuan germisidalnya disebabkan oleh asam hipoklorit HOCl (hypochlorous acid) yang terbentuk saat klorin ditambahkan dengan air. Asam hipoklorit tersebut akan mengoksidasi protein sehingga membran sel rusak dan terjadi inaktivasi enzim mikroorganisme. Perlakuan dilakukan minimal selama 30 menit.

Alkohol efektif membunuh bakteri dan fungi namun tidak dapat membunuh endospora dan virus *non-enveloped*. Mekanisme aksi alkohol adalah dengan mendenaturasi protein mikroorganisme, melarutkan lipid dari membran mikroorganisme termasuk lipid pada virus bersampul (*enveloped virus*). Konsentrasi optimal etanol adalah pada konsentrasi 70-80%, dan konsentrasi etanol antara 60-90% terlihat lebih cepat membunuh mikroorganisme. Etanol murni memiliki aktivitas antimikroba lebih rendah dibandingkan etanol yang terlarut dalam air. Hal ini disebabkan karena proses denaturasi protein diperlukan adanya air. (18)

II.2.4 Kultur Kalus

Kalus adalah jaringan tak berbentuk, saling berlekatan tetapi tidak teratur, yang dibentuk dari pembelahan yang hebat dari sel tanaman. Pada kultur, kalus diinisiasi dengan menempatkan potongan kecil dari tanaman (eksplan) di atas media yang dapat mendukung pertumbuhan dibawah kondisi steril. (7)

Dalam budidaya in vitro atau budidaya kultur jaringan, menginduksi terbentuknya kalus merupakan salah satu langkah penting. Setelah itu diusahakan merangsang agar terjadi diferensiasi, terjadi akar dan tunas. (6)

Pemilihan eksplan

Kultur kalus dapat diinduksi dari bermacam-macam organ tanaman misalnya akar, daun, tangkai daun, tunas, 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. (11)

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



II.2.4 Kultur Kalus

Kalus adalah jaringan tak berbentuk, saling berlekatan tetapi tidak teratur, yang dibentuk dari pembelahan yang hebat dari sel tanaman. Pada kultur, kalus diinisiasi dengan menempatkan potongan kecil dari tanaman (eksplan) di atas media yang dapat mendukung pertumbuhan dibawah kondisi steril. (7)

Dalam budidaya in vitro atau budidaya kultur jaringan, menginduksi terbentuknya kalus merupakan salah satu langkah penting. Setelah itu diusahakan merangsang agar terjadi diferensiasi, terjadi akar dan tunas. (6)

Pemilihan eksplan

Kultur kalus dapat diinduksi dari bermacam-macam organ tanaman misalnya akar, daun, tangkai daun, tunas, 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. (11)

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

II.2.4 Kultur Kalus

Kalus adalah jaringan tak berbentuk, saling berlekatan tetapi tidak teratur, yang dibentuk dari pembelahan yang hebat dari sel tanaman. Pada kultur, kalus diinisiasi dengan menempatkan potongan kecil dari tanaman (eksplan) di atas media yang dapat mendukung pertumbuhan dibawah kondisi steril. (7)

Dalam budidaya in vitro atau budidaya kultur jaringan, menginduksi terbentuknya kalus merupakan salah satu langkah penting. Setelah itu diusahakan merangsang agar terjadi diferensiasi, terjadi akar dan tunas. (6)

Pemilihan eksplan

Kultur kalus dapat diinduksi dari bermacam-macam organ tanaman misalnya akar, daun, tangkai daun, tunas, 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. (11)

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

II.2.4 Kultur Kalus

Kalus adalah jaringan tak berbentuk, saling berlekatan tetapi tidak teratur, yang dibentuk dari pembelahan yang hebat dari sel tanaman. Pada kultur, kalus diinisiasi dengan menempatkan potongan kecil dari tanaman (eksplan) di atas media yang dapat mendukung pertumbuhan dibawah kondisi steril. (7)

Dalam budidaya in vitro atau budidaya kultur jaringan, menginduksi terbentuknya kalus merupakan salah satu langkah penting. Setelah itu diusahakan merangsang agar terjadi diferensiasi, terjadi akar dan tunas. (6)

Pemilihan eksplan

Kultur kalus dapat diinduksi dari bermacam-macam organ tanaman misalnya akar, daun, tangkai daun, tunas, 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. (11)

Penyiapan dan sterilisasi eksplan

Pada prinsipnya ada empat macam sumber infeksi: tumbuhan, medium hara (yang tidak cukup steril), udara dan peneliti (ketidacermatan dalam bekerja). Hal yang terpenting adalah tumbuhan



itu sendiri dan materi tumbuhan harus disterilisasi sebaik-baiknya sebelum diisolasi secara *in vitro*.

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 17 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 (tempatkan dalam alkohol 96%, yang kemudian disterilisasi dengan nyala api). (15)

Induksi kalus, subkultur dan pemeliharaan kultur kalus

Pembentukan kalus dimulai dengan memindahkan eksplan secara aseptik ke dalam media terpilih dan dengan hati-hati ditekan ke dalam agar sehingga eksplan dan agar saling bersinngungan dengan baik.

Wadah ditutup dengan aluminium foil atau parafilm untuk mencegah penguapan, kemudian diinkubasi pada suhu sekitar 25°C. Eksplan pada media terpilih tersebut akan membentuk kalus yang cukup selama 3-8 minggu dan siap disubkulturkan. (17)

Pertumbuhan kalus selama periode waktu tertentu setelah disubkultur dapat diukur secara kuantitatif antara lain dengan parameter penambahan 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. (7)

Banyak sekali faktor yang dapat mempengaruhi 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, pisang dan lain-lain; macam dan kondisi lingkungan kultur seperti cahaya dan suhu ruangan kultur. (11)

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 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.

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. Cahaya

Intensitas cahaya yang rendah dapat mempertinggi embryogenesis dan organogenesis. Cahaya ultraviolet dapat mendorong pertumbuhan dan pembentukan tunas dari kalus tembakau pada intensitas yang rendah. Pembentukan kalus yang maksimum sering terjadi di tempat yang gelap.

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 diferensiasi. (9)

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. Larutan stok mikro dan makro mineral, elemen besi, vitamin dan mio inositol disiapkan untuk pembuatan media MS. Masing – masing larutan stok dimasukkan kedalam labu Erlenmeyer yang berisi 250 ml air suling. Kemudian hormon tumbuh 2,4 Diklorofenoksiasetat (2,4-D) dengan konsentrasi 1 mg/l (M1) ditambahkan ke dalam labu Erlenmeyer yang berisi larutan stok. Glukosa sebanyak 20 gram dimasukkan ke dalam larutan media kemudian diaduk sampai larut. Volumnya dicukupkan hingga 500 ml. Selanjutnya pH larutan media ditetapkan 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. Agar-agar dimasukkan 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. Dengan cara yang sama, media MS dibuat dengan konsentrasi 2,4-D yang berbeda yaitu 3 mg/l (M2) dan 5 mg/l (M3).

III. 3 Penyiapan Eksplan

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

III. 4 Sterilisasi

III. 4. 1 Sterilisasi Alat

Alat-alat gelas dan alat-alat bedah yang akan digunakan untuk kultur dicuci, kemudian dikeringkan, masing-masing alat dibungkus dengan kertas payung (kertas perkamen), dimasukkan ke dalam autoklaf dengan suhu 121°C, tekanan 1,5 kg/cm², 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 kg/cm² 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 NaOCI 5,25%). Larutan Bayclin® diencerkan dengan perbandingan 1:4. dan ditambahkan tween-20 sebanyak satu tetes.. Eksplan yang sebelumnya telah dicuci bersih dan dicuci dalam alkohol 70% dimasukkan ke dalam labu 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 ultra violet 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 ultra violet dinyalakan kembali untuk menjaga kondisi ruangan tetap steril.

III. 5 Penanaman Eksplan

Penanaman eksplan dilakukan dalam *Laminar Air Flow*. Eksplan yang telah siap untuk ditanam, dipotong dengan menggunakan pisau steril

di dalam cawan petri. Potongan eksplan dimasukkan ke dalam botol kultur yang masing-masing berisi media dengan hormon tumbuh yang berbeda yaitu 1mg/l (M1), 3 mg/l (M2), dan 5 mg/l (M3) hingga permukaan yang teriris bersentuhan dengan media, botol kultur ditutup kembali dengan rapat. Di inkubasi dengan suhu dan intensitas cahaya disesuaikan dengan yang dikehendaki.

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 di letakkan pada media baru yang komposisinya sama dengan media awal. Botol kultur ditutup rapat dan diinkubasi dengan suhu dan intensitas cahaya yang sesuai.

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 buah

mahkota dewa dan dielusi dengan eluen yang sesuai. 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 konsentrasi zat pengatur tumbuh 2,4-dichlorophenoxyacetic acid terhadap pertumbuhan kalus biji mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*)

Dari penelitian yang dilakukan diperoleh hasil sebagai berikut :

1. Bobot basah kalus pada media M1 (1 mg/l 2,4-D) adalah 1,1356 gram dan bobot kering kalus adalah 0,1221 gram.
2. Bobot basah kalus pada media M2 (3 mg/l 2,4-D) adalah 1,3478 gram dan bobot kering kalus adalah 0,2327 gram.
3. Bobot basah kalus pada media M3 (5 mg/l 2,4-D) adalah 1,8265 gram dan bobot kering kalus adalah 0,4571 gram.
4. Kandungan kimia pada kalus relatif sama dengan kandungan kimia pada kulit buah mahkota dewa.

IV.2 Pembahasan

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 kontaminasinya meskipun sudah dilakukan dengan berbagai metode, oleh karena itu dipilih biji mahkota dewa sebagai eksplan.

Sebelum eksplan ditanam dalam media, terlebih dahulu dilakukan proses sterilisasi dengan menggunakan larutan natrium hipoklorit (Bayclin® : air suling = 1:4). Hal ini dilakukan untuk mencegah kontaminasi yang mungkin timbul dari eksplan itu sendiri. Semua proses dalam metode kultur jaringan dilakukan dalam keadaan aseptis. Demikian pula dengan alat – alat yang digunakan, harus dalam keadaan steril.

Eksplan ditanam dalam botol kultur yang berisi media MS yang telah ditambahkan zat pengatur tumbuh 2,4-D pada konsentrasi yang bervariasi yaitu 1mg/l, 3 mg/l dan 5 mg/l. Menurut Gunawan Indayanto (1988), Untuk inisiasi pembentukan kalus pada beberapa eksplan hanya diperlukan kurang dari 0,1 mg/l, meskipun beberapa kultur jaringan yang lain memerlukan 5-10 mg/l untuk merangsang pembelahan sel. Totik Sri Mariani (2003) menemukan bahwa konsentrasi 2,4-D yang paling baik untuk pertumbuhan kalus *Alium sativum* L kultivar Lumbu Hijau adalah 0,1 mg/l. Sedangkan Citra Bakti (2007) menemukan bahwa untuk memperoleh pertumbuhan kalus optimum pada jahe dibutuhkan 3 mg/l 2,4-D.

Satu minggu setelah penanaman, belum terlihat perubahan yang berarti. Namun eksplan yang ditanam menunjukkan pengkerutan. Kalus baru terlihat pada minggu kedua setelah penanaman. Terbentuknya kalus ditandai dengan adanya penambahan sel biji pada bagian yang teriris. Sel inilah yang selanjutnya akan berkembang menjadi jaringan yang tidak tertata. Jika kalus sudah terbentuk, dilakukan penimbangan tiap minggu

terhadap bobot kalus yang terbentuk itu. Semakin besar ukuran kalus menunjukkan semakin tinggi aktifitas dan jumlah sel – sel jaringan awal yang membelah diri. (Suseno Amin dkk)

Pada minggu awal penanaman eksplan, belum terjadi pembentukan kalus, pada minggu kedua pertumbuhan kalus belum terlalu tampak, pada minggu ketiga pertumbuhan kalus meningkat pesat namun pertumbuhannya menurun lagi pada minggu keempat. Demikian pula pada subkultur, pada minggu awal belum tampak penambahan bobot kalus, pada minggu kedua kalus mulai berkembang, pada minggu ketiga terjadi perkembangan yang pesat dan minggu keempat menurun lagi. Hal ini telah dijelaskan oleh George dan Sherrington (1984) bahwa 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.

Pada minggu keempat, dilakukan subkultur dengan memindahkan kalus yang telah terbentuk pada media baru yang sama. Subkultur ini dilakukan untuk mendapatkan kalus yang lebih banyak. Karena jika kalus dibiarkan saja pada media awal, akan menyebabkan kekurangan nutrisi dan kalus menjadi rusak. Subkultur ini dilakukan sebanyak dua kali tiap 4 minggu dan diamati penambahan bobot kalus tiap minggunya.

Kalus yang terbentuk awalnya berwarna putih yang kemudian akan berubah menjadi putih kecokelatan dengan bertambahnya umur. Struktur kalus yang terbentuk pada eksplan adalah agak remah pada bagian atas, dan bertekstur kompak pada bagian bawah. Pembentukan kalus dipengaruhi oleh zat-zat tertentu dalam media seperti zat pengatur tumbuh. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Torrey dan Shigemura (1972) yang dikutip dalam penelitian Rahayu dkk. (2003) bahwa pada tanaman *Pea* konsentrasi 2,4-D dan ekstrak khamir yang tinggi akan menghasilkan kalus bertekstur remah.

Dari ketiga variasi konsentrasi 2,4-D yang diberikan, yang menunjukkan bobot kalus paling tinggi adalah pada media M3 dengan konsentrasi 5 mg/l 2,4-D dibandingkan dengan konsentrasi 1 mg/l dan 3 mg/l. Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi zat pengatur tumbuh 2,4-D yang paling baik untuk pertumbuhan kalus biji mahkota dewa adalah 5mg/l. Hal ini sesuai dengan penelitian Rahayu dkk (2003) bahwa semakin tinggi konsentrasi 2,4-D yang digunakan maka semakin meningkat bobot basah dan bobot kering kalus seperti pada gambar 4.

Menurut Harjoko (1999) dan Maftuchah (1998) yang dikutip dalam Rahayu dkk (2003), Pengaruh auksin terhadap pertumbuhan jaringan diduga menginduksi sekresi ion H^+ keluar melalui dinding sel; akibatnya air mudah masuk ke dalam sel dan sel akan membesar.

Setelah diperoleh kalus, dilakukan proses elusi dengan metode Kromatografi Lapis Tipis untuk mengidentifikasi kandungan kalus tersebut.

Metode ini diawali dengan proses ekstraksi kalus dengan metanol dan selanjutnya ditotolkan pada lempeng KLT bersama dengan pembanding dari ekstrak daging buah mahkota dewa dan dielusi dengan eluen tertentu. Dengan eluen heksan : etil asetat (1:1) setelah disemprot dengan asam sulfat didapatkan noda yang ada pada ekstrak daging buah mahkota dewa namun tidak terdapat pada ekstrak kalus dengan Rf 0,5 dan ada beberapa noda yang menumpuk di batas atas lempeng KLT yang terdapat pada ekstrak kalus dan ekstrak daging buah mahkota dewa. Demikian pula dengan eluen etil asetat 100%, diperoleh noda yang menumpuk. Dengan eluen heksan : etil asetat (3:1) diperoleh noda pada ekstrak buah mahkota dewa dan kalus dengan Rf yang sama yaitu 0,65. Jadi dapat dikatakan bahwa ada kesamaan profil KLT kalus biji dengan ekstrak buah mahkota dewa yang dapat dilihat pada gambar 9, 10 dan 11.



BAB V

PENUTUP

V.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan analisis data, maka dapat disimpulkan bahwa konsentrasi zat pengatur tumbuh 2,4-D yang optimum untuk pertumbuhan kalus biji mahkota dewa adalah 5 mg/L dengan kandungan kimia yang relatif sama dengan ekstrak daging buah mahkota dewa *Phaleria macrocarpa* (Scheff). Boerl.

V.2 Saran

Saran yang dapat dikemukakan dari hasil penelitian ini adalah :

1. Perlu penelitan lebih lanjut mengenai metabolit sekunder yang dihasilkan dalam tiap-tiap fase pertumbuhan kalus biji mahkota dewa baik jenis metabolit yang dihasilkan ataupun kadarnya.
2. Perlu dilakukan identifikasi senyawa-senyawa yang terdapat di dalam kalus biji mahkota dewa.
3. Perlu penelitian lanjutan mengenai pengaruh jenis dan kadar hormon lain terhadap produksi metabolit sekunder dari kultur kalus biji mahkota dewa.

DAFTAR PUSTAKA

1. Harmanto N. *Mahkota dewa obat pusaka para dewa*. Agromedia Pustaka. Jakarta. 2003. hal. 3, 5, 6 – 11.
2. Winarto. *Mahkota dewa : budi daya dan pemanfaatan untuk obat*. Penebar Swadaya, Jakarta. 2003. hal. 2
3. Rostini N. *Pengantar bioteknologi dalam pemuliaan tanaman*. Fakultas Pertanian Universitas Padjajaran. Jatinangor. 2000. hal. 11.
4. Staba EJ. *Plant tissue culture as a source of biochemicals*. CRC Press Inc. Boca Raton. Florida. 1982. hal. 2, 44, 45.
5. Wetter LR & Constabel F. *Metode kultur jaringan tanaman*, terjemahan oleh Mathilda B. Widiyanto. Ed. 2. ITB. Bandung. 1991. hal. 1 – 2.
6. Suryowinoto M. *Petunjuk laboratorium: pemuliaan tanaman secara in vitro*. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta. 1991. hal. 38.
7. George EF & Sherrington PD. *Plant propagation by tissue culture*. Exegetics Limited. 1984. hal 17, 184, 288.
8. Kors FTM. *Biochemicals plant cell and tissue culture*. Duchefa Bochemie BV. Netherlands. 2000. hal. 7, 50.
9. Hendaryono DPS & Wijayani A. *Teknik kultur jaringan*. Kanisius. Yogyakarta. 1994. hal. 18, 21, 26, 31, 33, 59 – 63, 68 – 70, 84
10. Pierik RLM. *In Vitro Culture Higher Plants*. Martinus Nijhoff Publisher. 1987. hal. 45, 54, 67, 69 – 71.
11. Indrayanto G *Kultur Jaringan Tanaman: Suatu Petunjuk Praktis Untuk Bidang Farmasi*. FAU Bioteknologi UGM. Yogyakarta. 1988. hal 23, 25, 28, 40, 55.
12. Wattimena GA. *Diktat zat pengatur tumbuh tanaman*. Lab Kultur Jaribgan Tanaman IPB. Bogor. 1987. hal 7, 161.
13. Rohyani Y. Penentuan Kandungan Flavonoid dari Ekstrak Metanol Daging Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* Scheff Boerl). *Jurnal Logika*. 2008. Vol.5 no.1. hal. 166-178.

14. Tambunan RM dan Simanjuntak P. Penentuan struktur kimia antioksidan benzofenon glikosida dari ekstrak n-butanol buah mahkota dewa. *Majalah Farmasi Indonesia*. 2006. Vol.4 no.17. hal. 184-189.
15. Budipramana LS. *Kultur Jaringan Tumbuhan*. Laboratorium Biologi FMIPA, Institut Keguruan dan Ilmu Pendidikan. Surabaya. 1991. hal. 5, 101
16. Butchner DN dan Ingram DS. *Plant Tissue Culture*. Edward Arnold (publisher) ltd. New York. 1974. hal. 55
17. Dixon RA. *Plant Cell Culture, a practical approach*. IRL Press. Oxford, Washington DC. 1987. hal. 11 – 14
18. Pratiwi ST. *Mikrobiologi Farmasi*. Erlangga. Jakarta. 2008. hal. 137-144.
19. Amien S, Ariyanti M, Arief M, Kurniawan D. Induksi kalus dari daun Nilam kultivar Loukseumaue, Sidikalang dan Tapaktuan dengan 2,4 D. *Jurnal Zuriat*. 2007. Vol.18 no.2 hal. 179-192.
20. Mariani TS, Miyake H, Esyanti RR, Nurwendah I. Effect of 2,4-D on Indirect somatic embryogenesis and surface structural changes in garlic (*Allium sativum* L.) cv. Lumbu Hijau. *Jurnal Matematika dan Sains*. Desember 2003. Vol.8 no.4 hal. 133-139.
21. Rahayu B, Solichatun, Anggarwulan E. Pengaruh Asam 2,4-Diklorofenoksiasetat (2,4-D) terhadap pembentukan dan pertumbuhan kalus serta kandungan flavanoid kultur kalus *Acalypha indica* L. *Sribd. Jurnal Biofarmasi*. Vol. 1 no. 1. Pebruari 2003. hal. 1-6.

LAMPIRAN 1.

Komposisi Media MS (Murashige and Skoog)

A. Makro Nutrien (mg/l)

NH_4NO_3	1650
KNO_3	1900
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
KH_2PO_4	170

B. Elemen Besi (mg/l)

Na_2EDTA	37,25
FeSO_4	27,85

C. Mikro nutrient (mg/l)

$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,3
$\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	8,6
H_3BO_3	6,2
KI	0,83
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025

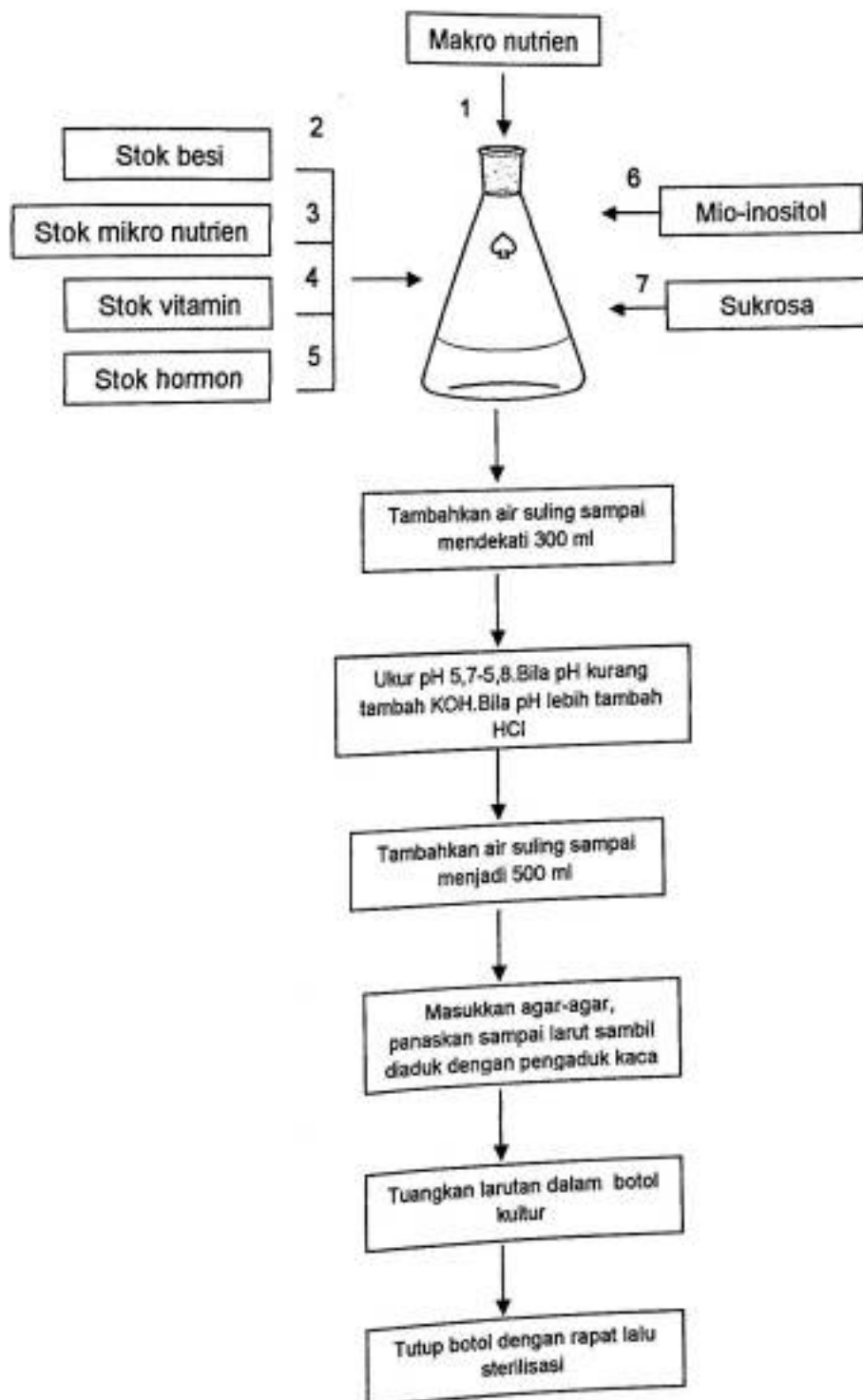
D. Vitamin (mg/l)

Asam nikotinat	0,5
Piridoksin HCl	0,5

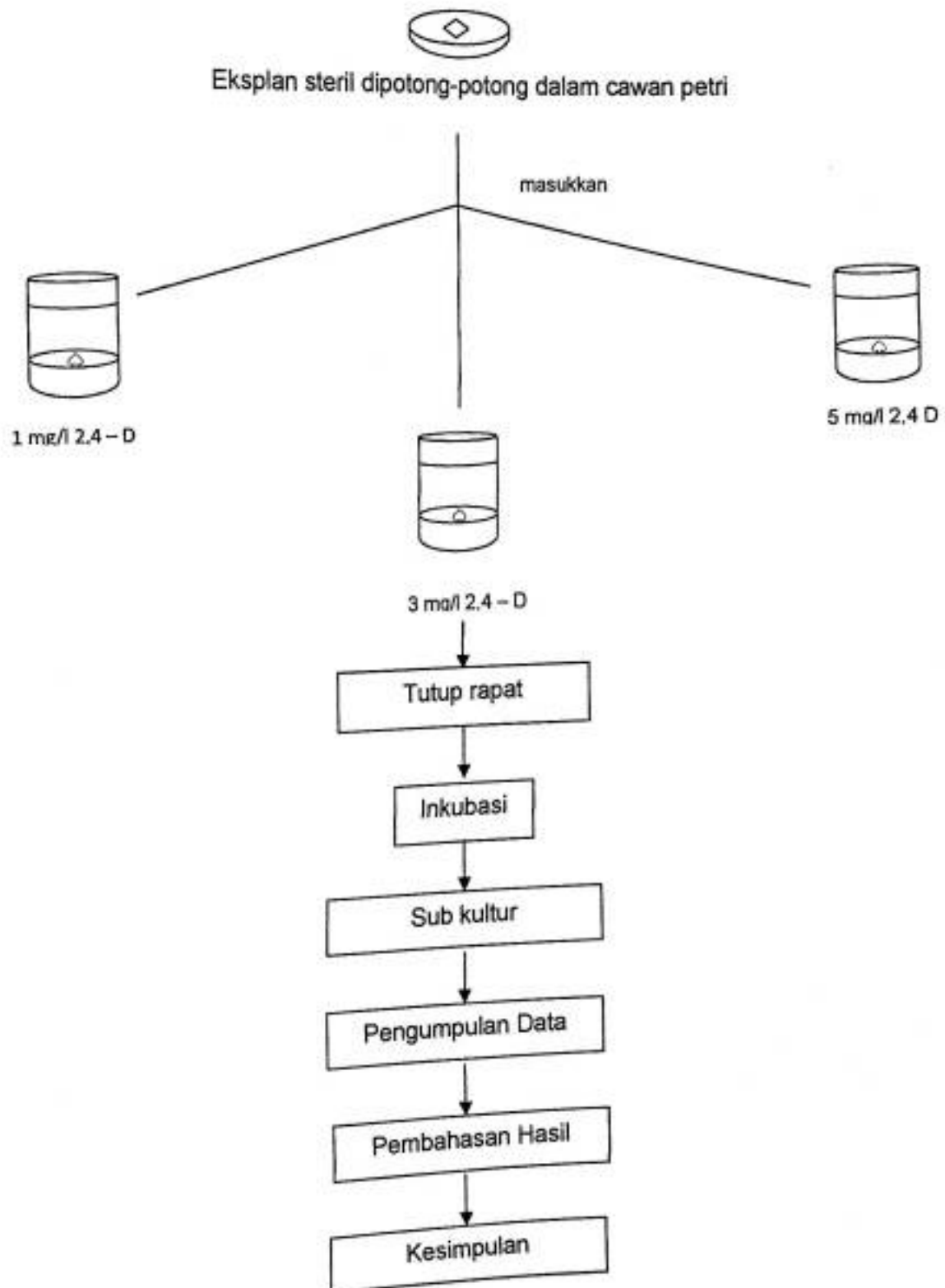
Tiamin HCl	0,1
Glisin	2,0
E. Zat Organik (mg/l)	
Mio inositol	100
Sukrosa	30.000
Serbuk Agar 1% b/v	
pH 5,7 – 5,8	

LAMPIRAN 2.

SKEMA KERJA PEMBUATAN MEDIA MURASHIGE DAN SKOOG (MS)



**SKEMA KERJA PENANAMAN EKSPLAN
BIJI MAHKOTA DEWA (*Phaleria macrocarpa*)**





YAYASAN KERAGAMAN HAYATI SULAWESI (KHAS)

Sekretariat Jalan Sunu Blok G No. 13 A Makassar 90214
Telp. (0411) 434663

Klasifikasi dari Mahkota Dewa adalah sebagai berikut:

Regnum	: Plantae
Divsio	: Spermatophyta
Subdivisio	: Angiospermae
Classis	: Dicotyledoneae
Subclassis	: Sympetalae
Ordo	: Thymelaeales
Familia	: Thymelaeaceae
Genus	: <i>Phaleria</i>
Species	: <i>Phaleria macrocarpa</i> (Scheff.) Boerl.
Nama Indonesia	: Mahkota Dewa

Mahkota Dewa termasuk tumbuhan yang daun mahkota bunganya berlekatan (Sympetalae), berbentuk seperti terompet.

Makassar, 4 Mei 2009

Dikerjakan oleh:

Dra. Elis Tambaru, M.Si.

Hj. Sri Suhadiyah, M.Agr.

Tabel 1. Data Pertambahan Bobot Kalus (g) Dengan Konsentrasi 1 mg/l 2,4-Diklorofenoksiasetat. Pada Awal Penanaman

	Botol 1	Botol 2	Botol 3	Botol 4	Rata-rata
Minggu 1	0	0	0	0	0
Minggu 2	0.0121	0.0152	0.0065	0.0165	0,0125
Minggu 3	0.1073	0.1196	0.0412	0.1089	0,0943
Minggu 4	0.155	0.1607	0.0651	0.1425	0,1308

Setelah Subkultur I

	Botol 1	Botol 2	Botol 3	Botol 4	Rata-rata
Minggu 1	0.0674	0.0709	0.0758	0.0815	0,0739
Minggu 2	0.1006	0.108	0.091	0.0951	0,0987
Minggu 3	0.1764	0.1774	0.1626	0.1581	0.1686
Minggu 4	0.2194	0.2264	0.2093	0.1999	0.2138

Setelah subkultur II

	Botol 1	Botol 2	Botol 3	Botol 4	Rata-rata
Minggu 1	0.1009	0.1073	0.1094	0.102	0.1049
Minggu 2	0.1295	0.1205	0.1226	0.1284	0.1253
Minggu 3	0.2495	0.2305	0.2581	0.2431	0.2453
Minggu 4	0.2883	0.2874	0.2881	0.2868	0.2877

Tabel 2. Data Pertambahan Bobot Kalus (g) Dengan Konsentrasi 3 mg/l 2,4-Diklorofenoksiasetat. Pada Penanaman Awal

	Botol 1	Botol 2	Botol 3	Rata-rata
Minggu 1	0	0	0	0
Minggu 2	0.0386	0.0308	0.0473	0.0389
Minggu 3	0.1203	0.1377	0.1491	0.1357
Minggu 4	0.1697	0.1846	0.1956	0.1833

Setelah Subkultur I

	Botol 1	Botol 2	Botol 3	Botol 4	Rata-rata
Minggu 1	0.0935	0.0992	0.0907	0.0916	0.0938
Minggu 2	0.1376	0.1475	0.1398	0.1407	0.1414
Minggu 3	0.2758	0.2809	0.2631	0.2759	0.2739
Minggu 4	0.3311	0.3231	0.3301	0.3069	0.3228

Setelah Subkultur II

	Botol 1	Botol 2	Botol 3	Botol 4	Rata-rata
Minggu 1	0.1187	0.1135	0.1174	0.1112	0.1152
Minggu 2	0.1307	0.1395	0.1305	0.1372	0.1345
Minggu 3	0.2644	0.2753	0.2891	0.2817	0.2776
Minggu 4	0.3344	0.3572	0.3415	0.3617	0.3492

Tabel 3. Data Pertambahan Bobot Kalus (g) Dengan Konsentrasi 5 mg/l 2,4-Diklorofenoksiasetat. Pada Awal Penanaman

	Botol 1	Botol 2	Botol 3	Botol 4	Rata-rata
Minggu 1	0	0	0	0	0
Minggu 2	0.0626	0.0602	0.0634	0.0708	0.0643
Minggu 3	0.1804	0.1684	0.1853	0.1731	0.1768
Minggu 4	0.2364	0.1971	0.2136	0.1967	0.2109

Setelah Subkultur I

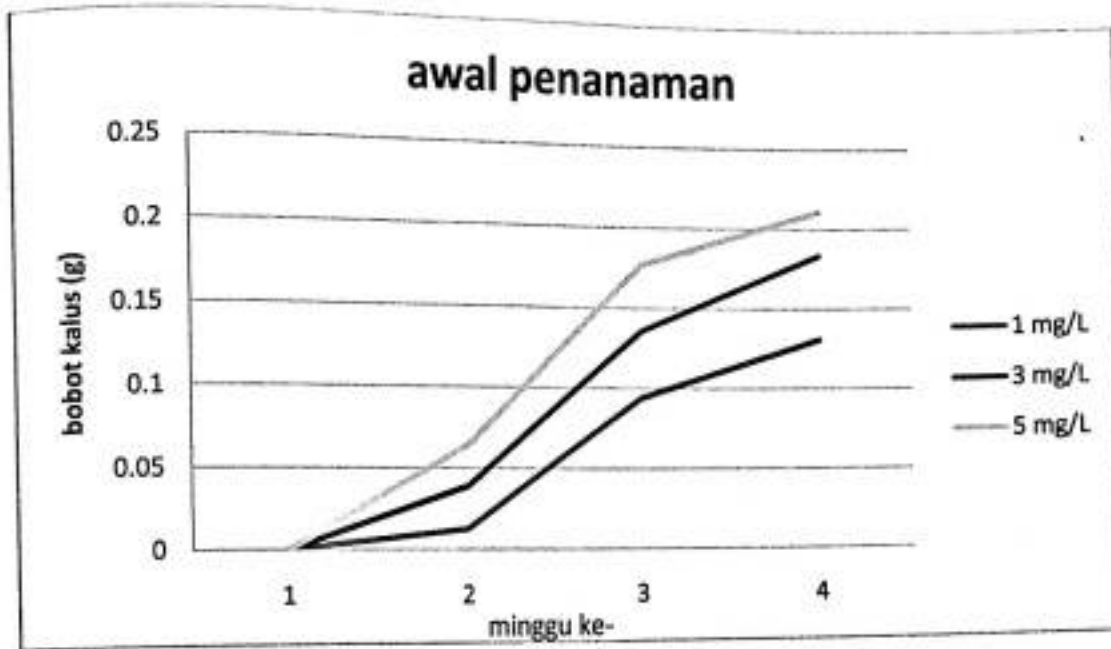
	Botol 1	Botol 2	Botol 3	Botol 4	Rata-rata
Minggu 1	0.0953	0.0971	0.0931	0.0941	0.0949
Minggu 2	0.1201	0.1285	0.1179	0.1224	0.1222
Minggu 3	0.2964	0.2995	0.3099	0.3063	0.3030
Minggu 4	0.3704	0.38	0.3854	0.3993	0.3838

Setelah Subkultur II

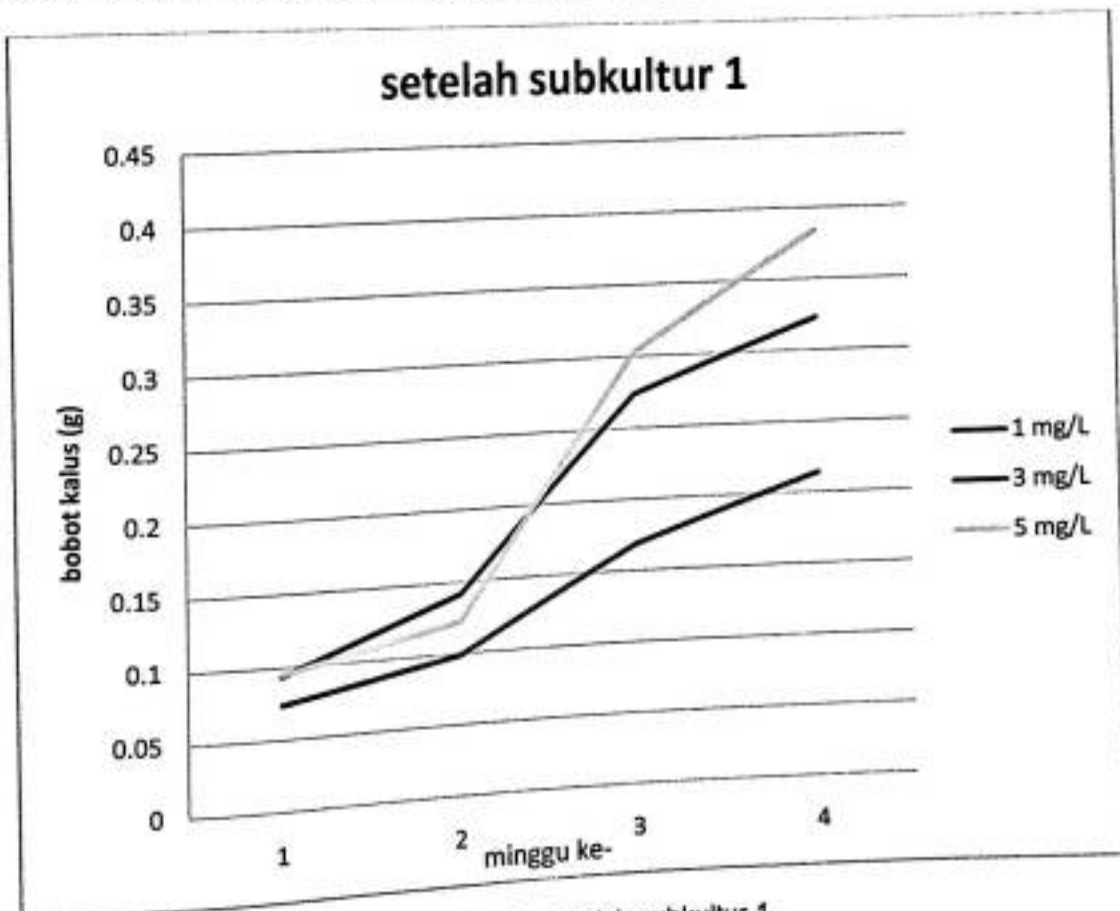
	Botol 1	Botol 2	Botol 3	Botol 4	Rata-rata
Minggu 1	0.1471	0.1411	0.1409	0.1478	0.1442
Minggu 2	0.1708	0.1705	0.1731	0.1809	0.1738
Minggu 3	0.3721	0.3651	0.3708	0.3695	0.3693
Minggu 4	0.4672	0.4408	0.465	0.4605	0.4584

Tabel 4. Daftar nilai Rf

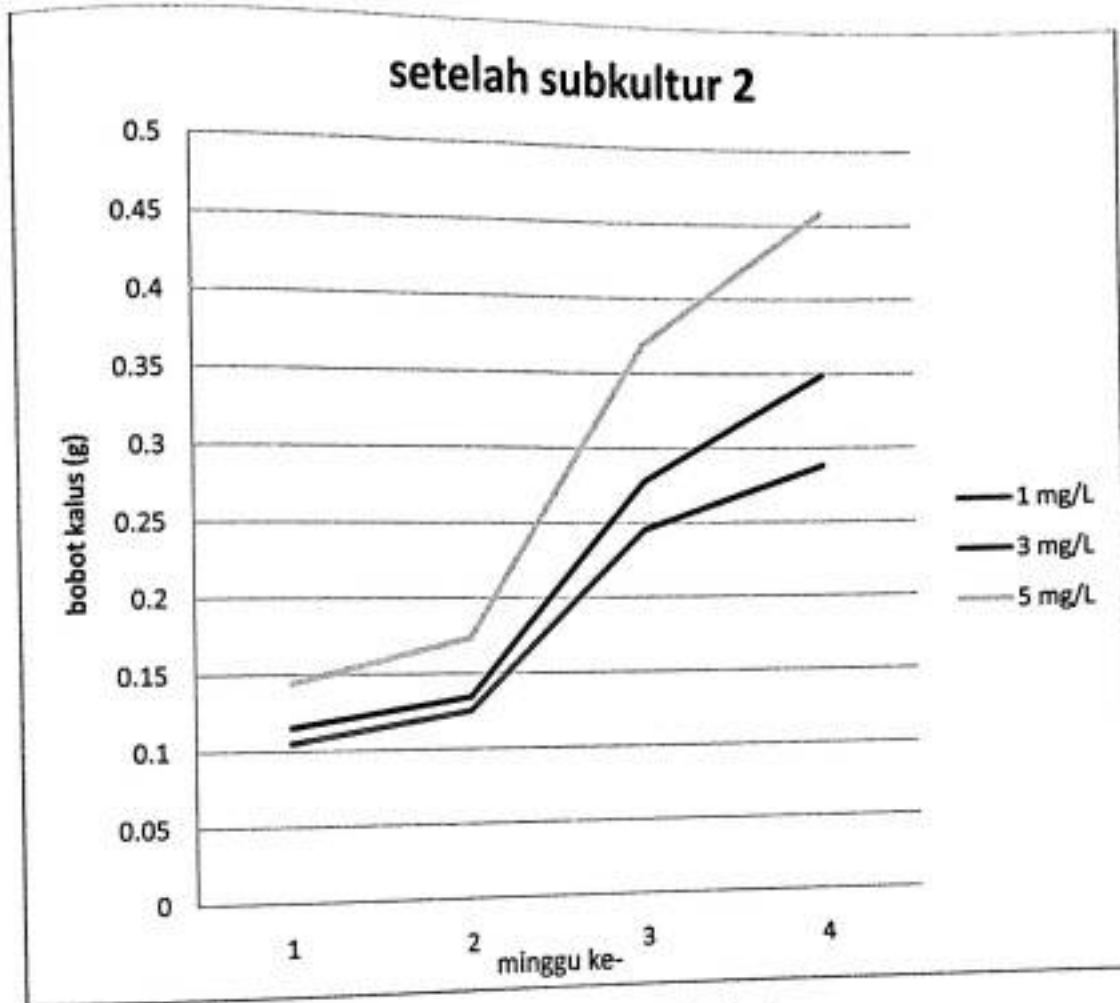
Eluen	Penampak noda	Rf	Keterangan
Heksan : etil asetat 1 : 1	Uv 366	0,97	Ekstrak buah mahkota dewa
	H ₂ SO ₄	0,5	Ekstrak buah mahkota dewa
	H ₂ SO ₄	0,89	Ekstrak buah mahkota dewa
	H ₂ SO ₄	0,89	Ekstrak kalus mahkota dewa
Heksan : etil asetat 3 : 1	UV 366	0,8	Ekstrak buah mahkota dewa
	H ₂ SO ₄	0,65	Ekstrak buah mahkota dewa
	H ₂ SO ₄	0,65	Ekstrak kalus mahkota dewa



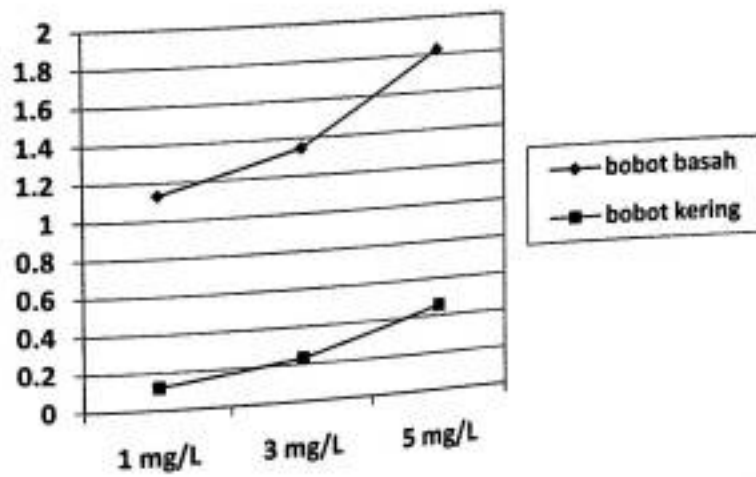
Gambar 1. Kurva pertambahan bobot kalus pada awal penanaman



Gambar 2. Kurva pertambahan bobot kalus setelah subkultur 1



Gambar 3. Kurva pertambahan bobot kalus setelah subkultur II



Gambar 4. Hubungan konsentrasi 2,4-D terhadap bobot basah dan bobot kering pada kalus *Phaleria macrocarpa* (Scheff) Boerl



1 mg/l



3 mg/l



5 mg/l

Gambar 5. Gambar Eksplan Pada Awal Penanaman



1mg/l



3 mg/l



5 mg/l

Gambar 6. Gambar Eksplan Berumur 1 bulan setelah penanaman



1 mg/l



3 mg/l



5 mg/l

Gambar 7. Gambar Kalus Setelah Subkultur I berumur 1 bulan



1 mg/l

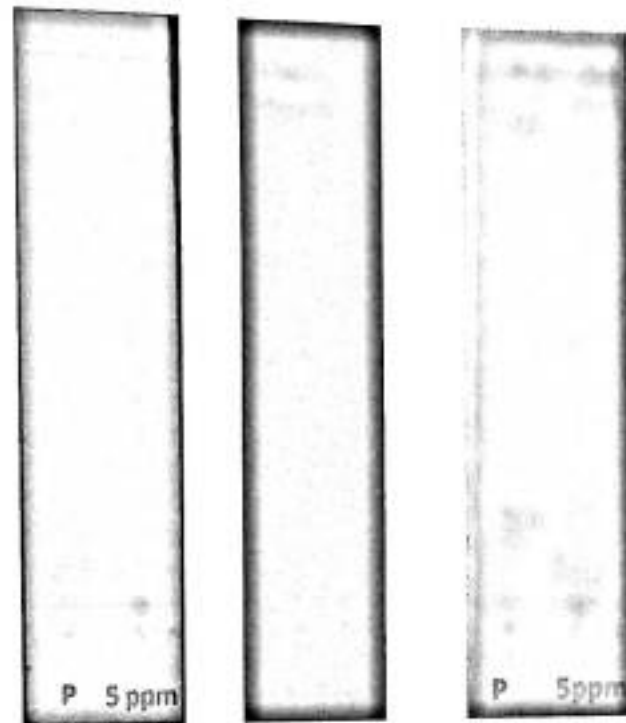


3 mg/l

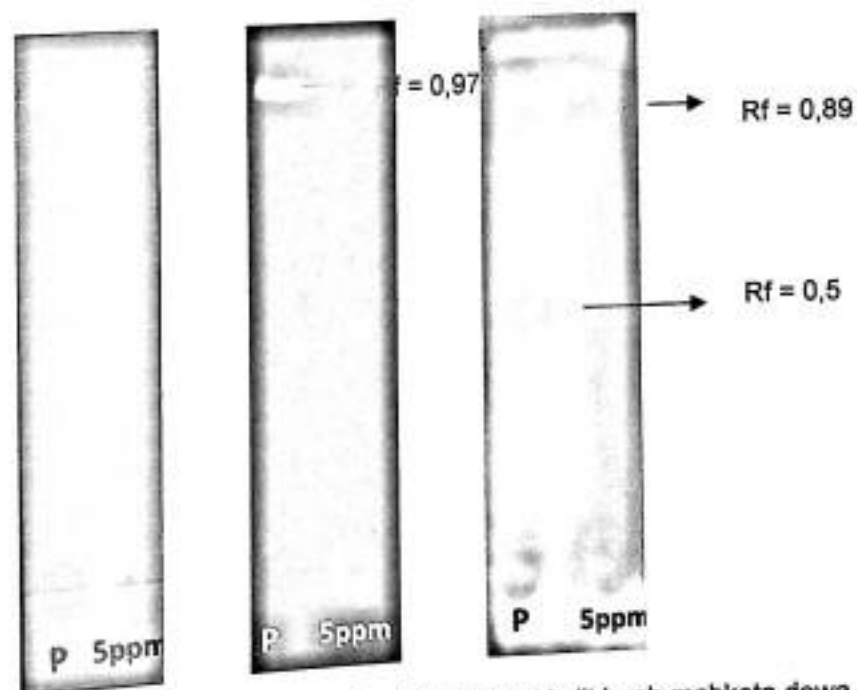


5 mg/l

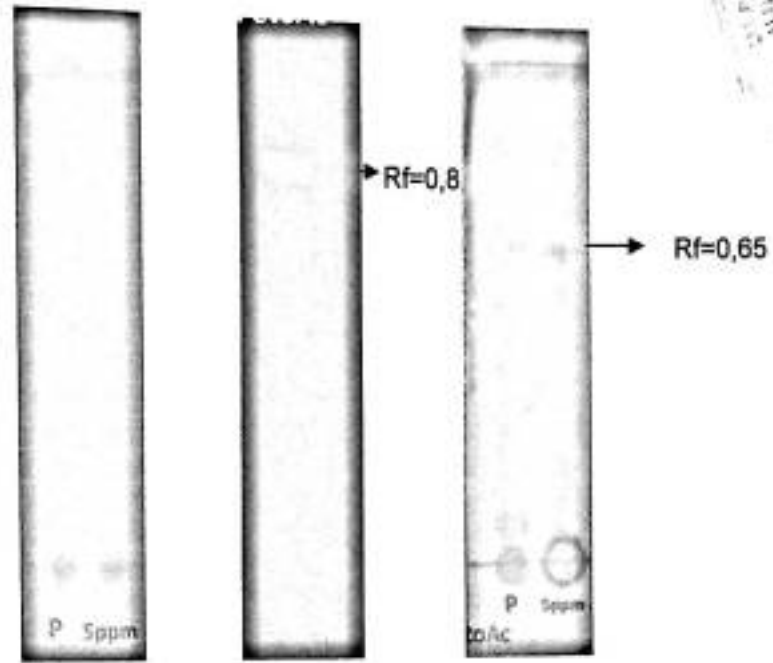
Gambar 8. Gambar kalus setelah subkultur II berumur 1 bulan



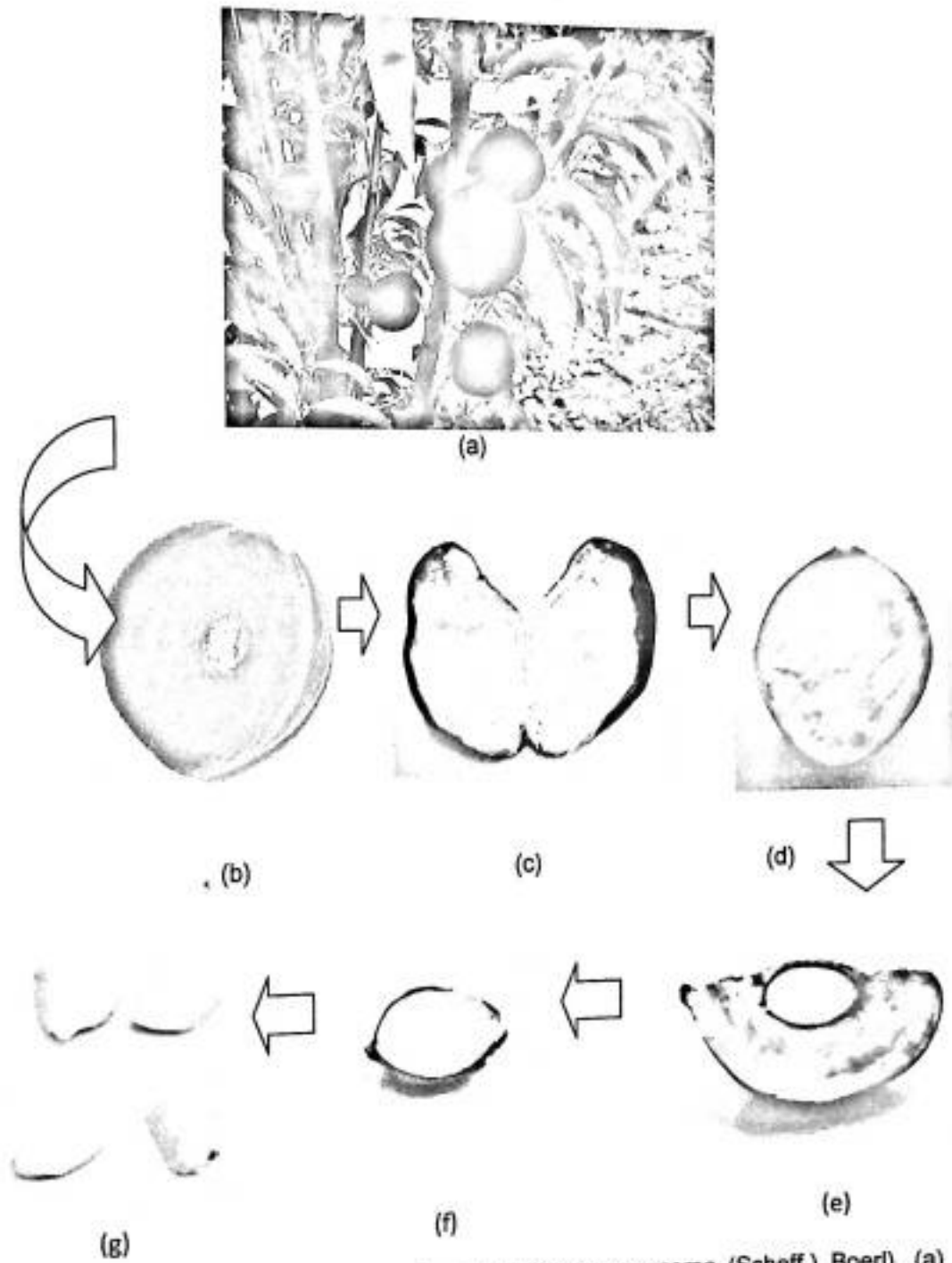
Gambar 9. Profil KLT dengan perbandingan (P) ekstrak metanol kulit buah mahkota dewa dan sampel (5mg/L) ekstrak kalus biji mahkota dewa dengan eluen etil asetat 100 %



Gambar 10. Profil KLT dengan perbandingan (P) ekstrak metanol kulit buah mahkota dewa dan sampel (5mg/L) ekstrak kalus biji mahkota dewa dengan eluen heksan : etil asetat (1:1)



Gambar 11. Profil KLT dengan pembanding (P) ekstrak metanol kulit buah mahkota dewa dan sampel (5mg/L) ekstrak kalus biji mahkota dewa dengan eluen heksan : etil asetat (3:1)



Gambar 12. Foto tanaman mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl), (a) tanaman mahkota dewa; (b) buah; (c), (d) dan (e) penampang membujur, (f) dan (g) potongan biji

