

Inisiasi Kalus Sanrego (*Lunasia Amara Blanco.*) dalam Kultur Jaringan

Heru Sudrajad, Didik Suharto, Nur Rahmawati Wijaya

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional, Badan Litbangkes, Kementerian Kesehatan Republik Indonesia

Jl. Lawu Tawangmangu, Surakarta 57792

*Corresponding author: herub2p2to2t@gmail.com

Abstract: Sanrego (*Lunasia amara Blanco*) merupakan salah satu tanaman yang berkhasiat sebagai apodisiak dan berpotensi untuk dikembangkan sebagai tanaman obat. Perbanyakannya secara alami mengalami kendala karena tanaman ini bersifat *slow growing species*. Salah satu alternatif untuk mendapatkan bibit yang seragam dan waktu yang singkat dan memproduksi metabolit sekunder adalah dengan teknik kultur jaringan. Penelitian dilakukan di laboratorium kultur jaringan Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional Tawangmangu dengan menggunakan media dasar MS (Murashige dan Skoog). Eksplan dari daun muda tanaman Sanrego. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang disusun secara faktorial dengan menggunakan dua faktor. Faktor pertama adalah konsentrasi zat pengatur tumbuh 2,4 D yang terdiri dari 3 taraf yaitu konsentrasi 2, 3 dan 4 ppm. Faktor kedua adalah konsentrasi glukosa yang terdiri dari 4 taraf yaitu glukosa konsentrasi 15, 20, 25 dan 30 g/l. Hasil penelitian menunjukkan kombinasi pemberian 2,4 D 3 sampai 4 ppm dan glukosa 15 sampai 30 g/l eksplan mengalami pembentukan kalus. Perlakuan kombinasi 2,4 D 2 ppm dan glukosa 15 g/l memberikan hasil yang lebih baik terhadap pembentukan kalus dengan waktu pembentukan kalus 25 hari setelah tanam.

Kata kunci : Sanrego, *Lunasia amara Blanco.*, Kultur Jaringan, 2,4 D, Glukosa

1. PENDAHULUAN

Produksi bibit merupakan salah satu aspek yang sangat penting dalam pengembangan suatu jenis tanaman. Pada saat ini untuk tanaman jenis obat dalam areal yang sangat luas selalu terbentur pada permasalahan penyediaan bibit. Untuk penyediaan bibit tanaman obat perlu diperhatikan kualitas dari bibit itu sendiri (Wahid, 1986).

Kultur jaringan tanaman merupakan salah satu bidang bioteknologi yang tidak hanya didominasi oleh kalangan akademis, tetapi telah menjadi alat utama bagi perbanyakannya tanaman dan pencaharian varietas tanaman baru oleh industri hortikultura dan tanaman pangan (Fowler, 1984). Bidang bioteknologi pertanian kultur jaringan selain dimanfaatkan sebagai cara untuk perbanyakannya tanaman juga dimanfaatkan plasma nutfah, variasi monoklonal dan sebagai sarana bagi rekayasa genetika untuk memperoleh tanaman yang bernilai tinggi (Indrayanto, 1987).

Inisiasi adalah pengambilan eksplan dari bagian tanaman yang akan dikulturkan. Perkembangan dari penerapan teknik jaringan adalah kemungkinan penggunaan kultur sel tanaman untuk memproduksi metabolit sekunder tanaman berkhasiat obat (Yuliarti, 2010).

Banyak senyawa-senyawa kimia alami seperti antibiotik, alkaloid, steroid, minyak atsiri, resin merupakan metabolit sekunder diperoleh secara komersial dengan cara mengisolasi dari tanaman, dan

hal ini menimbulkan permasalahan yang serius dengan terbatasnya sumber bahan baku untuk diisolasi. Sehubungan terbatasnya sumber bahan baku maka perlu dicari solusi alternatif lain dalam usaha penyediaan metabolit sekunder. Salah satu alternatif tersebut adalah melalui kultur jaringan tanaman yang sering disebut dengan kultur in vitro (Trease and Evans, 1978).

Permintaan kebutuhan akan bahan baku obat tradisional yang tinggi menyebabkan penggunaan teknik kultur jaringan semakin menarik, dimana dengan perkembangannya pemukiman penduduk sehingga habitat tempat tumbuh bahan tanaman obat semakin berkurang dan juga kekhawatiran dari perusahaan obat tradisional terhadap sulitnya bahan baku obat tradisional.

Sanrego merupakan tanaman obat potensial yang berasal dari Kawasan Timur Indonesia yang saat ini tergolong langka. Tanaman ini masih jarang ditemui dan merupakan tanaman endemik dari Sulawesi yang dapat digunakan sebagai obat kuat laki-laki/apodisiak. Bagian tanaman yang umum digunakan adalah akar, batang, dan daunnya. Tanaman ini digunakan dalam pengobatan tradisional oleh masyarakat di Kabupaten Bone, Sulawesi Selatan (Pramudiarja, 2012).

Habitat sanrego berbentuk pohon dengan tinggi tanaman dapat mencapai sekitar 5 m. Batang tegak, bercabang, dan daun agak kasar terutama pada bagian bawah. Tepi daun bergerigi dengan ujung

meruncing. Kulit batang berwarna coklat. Bunga keluar dari tunas ketiak, berwarna kuning muda. (Anonim, 1996).

Dalam teknik kultur jaringan tanaman sebagai perangsang pertumbuhan digunakan berbagai macam zat pengatur tumbuh antara lain auksin dan sitokinin. Auksin adalah senyawa zat pengatur tumbuh yang dicirikan oleh kemampuan yang menyebabkan terjadinya perpanjangan sel. Dalam kultur jaringan digunakan untuk merangsang pertumbuhan kalus, sususpensi sel dan organ tanaman terutama akar (Abidin, 1989). Hormon 2,4 D merupakan auksin yang paling kuat daya hambat terhadap morfogenesis, sehingga sering digunakan untuk menginduksi kalus dan suspensi sel.

Media kultur jaringan tumbuhan berisi garam-garam mineral, hormon, vitamin, sumber karbon, dan asam amino. Sumber karbon merupakan salah satu faktor yang sangat penting untuk menentukan keberhasilan kultur jaringan selain kombinasi zat tumbuh. Sumber karbon berfungsi sebagai sumber energi yang dibutuhkan oleh sel untuk dapat melakukan pertumbuhan (Kimball, 1994). Glukosa dan fruktosa sebagai hasil hidrolisis sukrosa dapat merangsang pertumbuhan beberapa jaringan. Konsentrasi sukrosa berpengaruh terhadap pertumbuhan kalus (Srilestari, 2005 dalam Sitorus, 2011).

2. BAHAN DAN METODE

Bahan penelitian yang digunakan berupa eksplan daun Sanrego (*Lunasia amara Blanco*, bahan kimia penyusun media MS (Murashige & Skoog), 2,4 D (Dichlorophenoxyacetic acid), glukosa, deterjen, sunclean, aquades steril dan alkohol. Alat yang digunakan yaitu alat yang digunakan Lamiar Air

Flow (LAF), Autoclaf, pinset, scalpel, hot plate, timbangan analitik, aluminium foil, pinset, petridish steril, pisau steril, ph stik, hot plate, bunsen, botol media dan erlenmeyer,

Tahapan penelitian adalah bahan penelitian eksplan daun sanrego (*Lunasia amara Blanco*) didalam rumah kaca. Pembuatan media yaitu bahan kimia ditimbang analitik sesuai dengan komposisi masing-masing untuk media MS (Lampiran). Penyiapan eksplan yaitu menggunakan daun muda dari tanaman sanrego (*Lunasia amara Blanco.*) yang ditangkarkan dalam rumah bibit umur tiga bulan. Proses sterilisasi, eksplan daun di cuci dengan sunclean kemudian dibilas dengan menggunakan aquadest steril. Selanjutnya direndam dalam larutan agrept selama 5 menit, dalam larutan dithane 5 menit dan terakhir dalam larutan bayclean selama 5 menit kemudian dibilas dengan aquadest steril sebanyak 3 kali. Tahapan selanjutnya penanaman eksplan, dilakukan didalam Laminar air Flow secara aseptis, yang sebelumnya ruangan telah disterilkan dengan menyemprotkan alkohol kedalam ruangan dan di sinari dengan lampu ultraviolet selama 30 menit.

Penelitian dilakukan di laboratorium kultur jaringan Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional Tawangmangu dengan menggunakan media dasar MS (Murashige dan Skoog) (Lampiran). Penelitian menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap Pola Faktorial. Faktor pertama konsentrasi 2,4 D dengan konsentrasi 2, 3 dan 4 mg/l, sedangkan faktor kedua konsentrasi glukosa dengan konsentrasi masing-masing 15, 20, 25 dan 30 g/l. Parameter pengamatan adalah saat tumbuh kalus, pertumbuhan kalus selama diinkubasi selama 60 hari.

Perlakuan	Media	Awal Tumbuh Kalus (hst)	Pertumbuhan Kalus	Warna Kalus
2,4 D 2 ppm + glukosa 15 g/l)	MS	-	Mati	Berwarna coklat
2,4 D 2 ppm + glukosa 20 g/l)	MS	-	Mati	Berwarna coklat
2,4 D 2 ppm + glukosa 25 g/l)	MS	-	Mati	Berwarna coklat
2,4 D 2 ppm + glukosa 30 g/l)	MS	-	Mati	Berwarna coklat
2,4 D 3 ppm + glukosa 15 g/l)	MS	29,0	Kalus (+)	Berwarna putih
2,4 D 3 ppm + glukosa 20 g/l)	MS	26,3	Kalus (++)	Berwarna putih
2,4 D 3 ppm + glukosa 25 g/l)	MS	26,7	Kalus (++)	Berwarna putih
2,4 D 3 ppm + glukosa 30 g/l)	MS	30,3	Kalus (+)	Berwarna putih
2,4 D 4 ppm + glukosa 15 g/l)	MS	25,0	Kalus (+++)	Berwarna putih
2,4 D 4 ppm + glukosa 20 g/l)	MS	26,0	Kalus (++)	Berwarna putih
2,4 D 4 ppm + glukosa 25 g/l)	MS	26,3	Kalus (++)	Berwarna putih
2,4 D 4 ppm + glukosa 30 g/l)	MS	29,7	Kalus (+)	Berwarna putih

NB : + = sedikit, ++ = agak banyak, +++ = banyak, hst = hari setelah tanam

2.1 Waktu Tumbuh Kalus

Hasil pada tabel 1 menunjukkan bahwa kombinasi perlakuan 2,4 D dan sukrosa dengan konsentrasi yang berbeda pada media MS (Murashige dan Skoog) berpengaruh terhadap rata-rata awal tumbuh kalus. Pada media MS pada konsentrasi 2,4 D 2 ppm dengan sukrosa 15 sampai 30 g/l tidak tumbuh kalus

pada eksplan, Hal ini kemungkinan dikarenakan konsentrasi 2,4 D terlalu sedikit sehingga belum efektif untuk menginduksi terbentuknya kalus pada eksplan daun sanrego. Respon auksin berhubungan dengan konsentrasinya. Pengaruh konsentrasi juga berhubungan dengan jenis zat pengatur tumbuh.

Perlakuan 2,4 D konsentrasi 3 sampai 4 ppm dengan glukosa 15 sampai 30 g/l menunjukkan adanya pertumbuhan kalus. Hal ini kemungkinan



dikarenakan konsentrasi 2,4 D terlalu sedikit sehingga belum efektif untuk menginduksi terbentuknya kalus pada eksplan daun sanrego. Respon auksin berhubungan dengan konsentrasinya. Pengaruh konsentrasi juga berhubungan dengan jenis zat pengatur tumbuh.

Semakin tinggi konsentrasi 2,4 D akan diperoleh rata-rata awal tumbuh kalus yang lebih cepat, sedangkan semakin tinggi glukosa akan semakin lambat terhadap rata-rata awal tumbuh kalus. Kombinasi perlakuan 2,4, D 4 ppm dan glukosa 15 g/l memberikan hasil lebih baik terhadap waktu pembentukan kalus 25 hari setelah tanam (hst). Senyawa 2,4-D merupakan salah satu jenis auksin yang sangat efektif untuk menginduksi pembentukan kalus. Auksin adalah senyawa zat pengatur tumbuh yang dicirikan oleh kemampuan yang menyebabkan terjadinya perpanjangan sel. Dalam kultur jaringan digunakan untuk merangsang pertumbuhan kalus, suspensi sel dan organ tanaman terutama akar.

Pada kombinasi perlakuan 2,4, D 4 ppm dan glukosa 15 g/l memberikan hasil lebih baik terhadap pembentukan kalus dengan waktu pembentukan kalus 25 hari setelah tanam. Penambahan 2,4-D dalam media kultur akan merangsang pembelahan dan pembesaran sel pada eksplan sehingga dapat memacu pembentukan dan pertumbuhan kalus (Bekti, 2003 dalam Sugiyarto dan Kuswandi, 2014). Hal serupa menyatakan bahwa 2,4-D dapat menyebabkan elongasi sel, pembengkakan jaringan dan pembentukan kalus (Pierik, 1987)

Pengaruh auksin terhadap pertumbuhan jaringan tanaman diduga melalui dua cara yaitu meningkatkan induksi air kedalam sel akibat sekresi ion H^+ dan pengambilan ion K^+ dan mempengaruhi metabolisme RNA yang mengakibatkan terbentuknya RNA baru dan pembentukan protein (Abidin, 1989). Seperti disampaikan oleh Sitorus dkk, 2011 dalam Marlin, 2005 dan Srilestari, 2005, bahwa Induksi kalus embrio somatik kacang tanah pada media MS dengan konsentrasi sukrosa 20, 30 dan 40 g/l menunjukkan hasil bahwa, media yang mengandung sukrosa 40 g/l, embrio tumbuh lebih cepat dibandingkan pada yang lainnya, namun pada induksi kalus rimpang jahe konsentrasi sukrosa diatas 60 g/l dapat menghambat.

2.2 Pertumbuhan Kalus

Pada tabel 1 dapat diketahui bahwa kombinasi perlakuan 2,4 D konsentrasi 2 ppm dengan glukosa konsentrasi 15 sampai 30 g/l pada media MS, eksplan berwarna coklat dan mati. Pencoklatan (*browning*) dapat terjadi karena jaringan tumbuhan baru disayat atau dipotong (Collins dan Edwards (1998). Sanrego merupakan salah satu tumbuhan yang menghasilkan senyawa fenolik. Senyawa fenolik dihasilkan sebagai respon tumbuhan karena stress. Pencoklatan merupakan hasil oksidasi senyawa fenolik yang diproduksi jaringan dan oksigen dalam botol kultur. Stress pada jaringan kemaitan dapat terjadi karena eksplan kemaitan disayat terlebih dahulu sebelum ditanam pada media

tanam. Jaringan yang stress tersebut kemudian menghasilkan senyawa fenolik yang bereaksi dengan oksigen dalam botol kultur. Senyawa fenolik terutama ditemukan pada eksplan yang berasal dari alam (Palacio *et al.* 2012).

Eksplan sanrego mengalami kematian sampai pengamatan umur 60 hari, hal ini kemungkinan konsentrasi 2,4 D belum berpengaruh terhadap eksplan sanrego untuk menginduksi terbentuknya kalus pada eksplan. Berdasarkan penelitian yang dilakukan Denish (2007) eksplan kemaitan tetap bertahan hidup selama 12 minggu setelah tanam.

Hasil selanjutnya menunjukkan bahwa kombinasi perlakuan 2,4 D konsentrasi 3 sampai 4 ppm dan glukosa konsentrasi 15 sampai 30 g/l eksplan mengalami pembentukan kalus dengan masa inkubasi 60 hari, hal ini dikarenakan perlakuan 2,4 D dengan glukosa sudah mulai berpengaruh nyata terhadap perubahan ekplan yaitu mulai efektif terhadap pembentukan kalus. Demikian juga kombinasi perlakuan 2,4 D konsentrasi 4 ppm dan glukosa 15 sampai 30 g/l juga memberikan hasil terhadap pembentukan kalus dengan warna kalus putih. Warna putih pada kalus disebabkan karena kalus yang dihasilkan baru terbentuk sehingga eksplan sanrego.

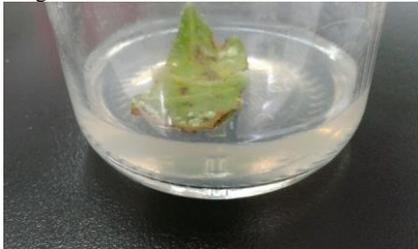
Pada kombinasi perlakuan 2,4, D 4 ppm dan glukosa 15 g/l memberikan hasil lebih baik terhadap hasil pembentukan kalus lebih baik. Penambahan 2,4-D dalam media kultur akan merangsang pembelahan dan pembesaran sel pada eksplan sehingga dapat memacu pembentukan dan pertumbuhan kalus (Bekti, 2003 dalam Sugiyarto dan Kuswandi, 2014). Sukrosa yang ditambahkan 15 sampai 30 g/l pada media MS diperoleh hasil tumbuh kalus. Sukrosa yang ditambahkan akan menjadi sumber energi sel-sel eksplan, sehingga sel dapat mengalami pembentangan dan pembelahan selanjutnya akan membentuk kalus. Kultur kalus merupakan budidaya secara heterotrof. Sel tidak dapat melakukan fotosintesis untuk menghasilkan karbon seperti halnya tanaman autotrof, sehingga sumber karbon harus diperoleh dalam bentuk karbohidrat yang ditambahkan dari luar. Gula merupakan sumber karbon sebagai pengganti karbon yang biasanya Induksi Kalus Sanrego diperoleh tanaman dari atmosfer dalam bentuk CO_2 untuk bahan fotosintesis. Jika tidak ada sukrosa, maka aktivitas dan pertumbuhan kalus tidak dapat berlangsung dan pada akhirnya sel-sel tersebut akan mati, karena tidak ada sumber energi. Hal tersebut membuktikan bahwa sukrosa merupakan komponen penting yang harus tersedia dalam media kultur jaringan tumbuhan (Sitorus dkk, 2011)

Pemberian sukrosa dalam media akan menjadi sumber energi dan sumber karbon bagi sel-sel eksplan untuk dapat tumbuh. Peningkatan konsentrasi sukrosa yang diberikan akan menyebabkan eksplan memperoleh sumber energi dan sumber karbon yang lebih banyak, sehingga akan dapat mempercepat pertumbuhan eksplan. Sumber energi yang semakin banyak mengakibatkan pembelahan sel yang lebih cepat sehingga

pertumbuhan kalus akan lebih cepat. Sukrosa juga dapat menjaga tekanan osmotik media. Pada media yang mengandung sukrosa lebih banyak akan mengakibatkan gradien konsentrasi yang lebih tinggi antara media dengan sel eksplan. Media dengan gradien konsentrasi yang lebih tinggi ini akan mengakibatkan gerakan difusi lebih cepat ke dalam sel yang mempunyai konsentrasi yang lebih rendah (Salisbury & Ross, 1995). Keadaan ini menyebabkan sel-sel eksplan pada konsentrasi sukrosa 15-30 g/l dapat menyerap nutrisi lebih baik dalam media untuk pertumbuhannya.



Gambar 1. Media MS dengan hormon 2,4 D 2 ppm dan glukosa 25 g/l



Gambar 2. Media MS dengan hormon 2,4 D 3 ppm dan glukosa 15 g/l



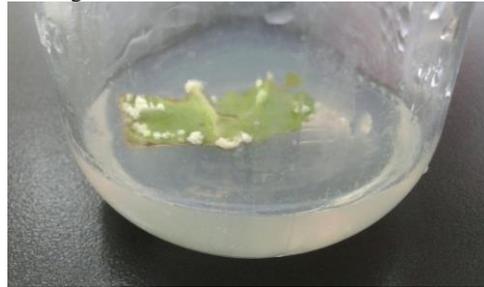
Gambar 3. Media MS dengan hormon 2,4 D 3 ppm dan glukosa 20 g/l



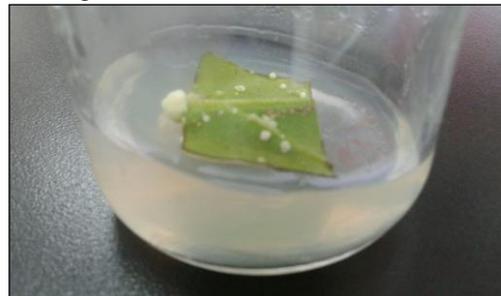
Gambar 4. Media MS dengan hormon 2,4 3 ppm dan glukosa 25 g/l



Gambar 5. Media MS dengan hormon 2,4 D 4 ppm dan glukosa 15 g/l



Gambar 6. Media MS dengan hormon 2,4 D 4 ppm dan glukosa 20 g/l



Gambar 1. Media MS dengan hormon 2,4 D 4 ppm dan glukosa 25 g/l



Gambar 1. Media MS dengan hormon 2,4 D 4 ppm dan glukosa 30 g/l

3. KESIMPULAN

Berdasarkan data hasil penelitian bahwa pola kultur jaringan sanrego dapat diterapkan sebagai awalan untuk teknik perbanyakan dan sarana studi kemungkinan pembentukan metabolit sekunder daun sanrego melalui teknik kultur jaringan

4. SARAN

Agar dilakukan pemelitiaasn lebih lanjut dengan dengan variable senyawa zat pengatur tumbuh yang lain dan agar dilakukan penelitian mengenai analisis kandungan kimia dari kalus sanrego.

5. UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih kami sampaikan kepada Balai Besar Penelitian Tanaman Obat dan Obat Tradisional beserta staf laboratorium kultur jaringan yang telah membantu sampa selesainya penelitian ini.

6. DAFTAR PUSTAKA

- Abidin ZA, *Dasar-Dasar Pengetahuan Zat Pengatur Tumbuh*, Penerbit Angkasa, Bandung, 1989.
- Anonim, 1996 Grin Taxonomy for Plants. <http://balitro.litbang.pertanian.go.id/ind/index.php/latest-news/262-teknik-perbanyakantanaman-sanrego-lunasia-amara>. 17 September 2013. Diakses 17 Juni 2016
- Denish A. 2007. *Percobaan perbanyakan Vegetatif Kemaitan (Lunasia amara Blanco.) melalui Kultur Jaringan*. [Skripsi]. Bogor: Departemen Konservasi Sumberdaya Hutan dan Ekowisata, Fakultas Kehutanan, Institut Pertanian Bogor.
- Fowler MW, *Comersial and Economic aspect of Mass Olant Cell Culture*, Cambridge Univ. London, 1984
- Gunawan, L.W., 1987. *Teknik Kultur Jaringan*. Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman PAU Bioteknologi IPB. Bogor
- Pramudiarja, 2012. *Teknik Perbanyakan Sanrego*. <http://balitro.litbang.pertanian.go.id/ind/index.php/latest-news/262-teknik-perbanyakantanaman-sanrego-lunasia-amara>. 17 September 2013. Diakses 17 Juni 2016
- Indrayanto G. 197. *Produksi Metabolit Sekunder dengan Teknk Kultur Jaringan Tanaman*. Seminar Nasional Metabolit Sekunder. UGM. Yogyakarta.
- Kimball, J.W. 1994. Biologi. Erlangga. Bogor
- Palacia L, JJ Cantero, RM Cusido, ME Goleniowski. 2012. Phenolic Compound Production in Relation to Differentiation in Cell and Tissue Cultures of *Larrea divaricata* (Cav.). *Plant Science* 193-194: 1-7.
- Pierik, R.I.M., 1987. *In Vitro Culture of Higer Plants*. Martinus Nijhoff Publishers Dordrecht, The Netherlands.
- Salisbury, F.B. dan Ross, W.C., 1995. *Fisiologi Tumbuhan Jilid Tiga*. Penerjemah. Lukman, D. R. Dan Sumaryono. Penerbit ITB: Bandung.
- Sitorus M, ED Hastuti, N Setiari. 2011. Induksi Kalus Binahong (*Basella rubra* L.) secara *In vitro* pada Media Murashige & Skoog dengan Konsentrasi Sukrosa yang Berbeda. *Bioma* 13(1): 1-7.
- Sugiyarto L., PC Kuswandi. 2014. Induksi Kalus Daun Binahong (*Anredera cordifolia* L.) Dalam

Upaya Pengembangan Tanaman Obat Tradisional. *J. Sains Dasar* 2014 3(1) 56 – 60.

Yuliarti N. 2010. *Kultur Jaringan Tanaman Skala Rumah Tangga*. Lily Publisher. Yogyakarta.

Penanya: Dr. Dorly

Pertanyaan:

- Eksplan yang digunakan?
- Kandungan kimia sanrego apa?
- Untuk kultur sel di bagian apa?
- Bagian apa yang digunakan untuk tanaman sanrego?

Jawaban:

- Eksplan yang digunakan adalah daun muda sanrego, tidak mengguakan kulit atau akar. akarnya akan menahan tanaman dan otomatis akan banyak bahan jamur
- Kandunagn kimia sanrego adalah steroid
- Belum sampai ke sifat
- Yang digunakan bagian daun, kulit dan akar