

Kajian Konsentrasi Naa Dan Kinetin Terhadap Pertumbuhan Kalus Dari Kotiledon Sambiloto (*Andrographis Paniculata* Ness.) Secara *In Vitro*

Veronica Krestiani, Rukmi¹

Diterima : 13 Maret 2013

disetujui : 9 Mei 2013

diterbitkan : 20 Juni 2013

ABSTRACT

*This study was conducted to determine the effect of plant growth regulators NAA and Kinetin on callus growth with cotyledon explants sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.). Experiments conducted in the Tissue Culture Laboratory of the Agriculture Faculty of Muria Kudus University, from April to September 2012.*

The research used factorial experiment with completely randomized block design (RCBD) consists of two factors, namely the three level NAA concentration is 0 ppm, 0.5 ppm, and 1.0 ppm and the concentration of Kinetin with three level is 0 ppm, 0.5 ppm, 1.0 ppm, thus acquired 9 treatment combinations.

In this study, sterile cotyledon callus began to grow on the seventh day after plant and further more developed into a callus on the entire surface of the cotyledons except on not treated in the control treatment did not grow callus but grows apical buds. While the callus that produced has a hard structure, dense texture with varied color from light green to light brown.

Keywords : NAA, Kinetin, callus culture, and *Andrographis paniculata* Nees

ABSTRAK

Penelitian ini dilaksanakan untuk mengetahui pengaruh zat pengatur tumbuh NAA dan kinetin terhadap pertumbuhan kalus dengan eksplan kotiledon sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.). Percobaan dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan Fakultas Pertanian Universitas Muria Kudus, pada bulan April sampai September 2012.

Penelitian menggunakan percobaan faktorial dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) terdiri dari dua faktor, yaitu konsentrasi NAA dengan tiga aras yaitu 0 ppm, 0,5 ppm, dan 1,0 ppm dan konsentrasi Kinetin dengan tiga aras yaitu 0 ppm, 0,5 ppm, 1,0 ppm, sehingga diperoleh 9 kombinasi perlakuan.

Pada penelitian ini kalus asal kotiledon steril mulai tumbuh pada hari ke tujuh dan seterusnya berkembang membentuk kalus pada seluruh permukaan kotiledon selain pada perlakuan kontrol tidak tumbuh kalus tetapi tumbuh tunas apikal, sedangkan kalus yang dihasilkan berstruktur keras, bertekstur padat dan warna kalus yang bervariasi dari hijau muda sampai coklat muda.

Kata kunci: NAA, Kinetin, kultur kalus, dan *Andrographis paniculata* Nees

¹ Staf Pengajar Fakultas Pertanian UMK

PENDAHULUAN

Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.) ialah tumbuhan semusim yang termasuk dalam famili Acanthaceae. Sambiloto ialah herba tegak, tumbuh secara alami di daerah dataran rendah hingga ketinggian \pm 1600 m dpl. Sambiloto tergolong tanaman terna (perdu) yang tumbuh di berbagai habitat, seperti pinggiran sawah, kebun, atau hutan.

Komponen utama sambiloto adalah andrographolide yang berguna sebagai bahan obat. Disamping itu, daun sambiloto mengandung saponin, flavonoid, alkaloid dan tanin. Kandungan kimia lain yang terdapat pada daun dan batang adalah laktone, panikulin, kalmegin dan hablur kuning yang memiliki rasa pahit. Secara tradisional sambiloto telah dipergunakan untuk pengobatan akibat gigitan ular atau serangga, demam, disentri, rematik, tuberculosis, infeksi pencernaan, dan lain-lain. Sambiloto juga dimanfaatkan untuk antimikroba/antibakteri, anti sesak napas dan untuk memperbaiki fungsi hati¹². Mengingat kandungan dan fungsi tanaman tersebut, saat ini sambiloto banyak diteliti untuk dikembangkan sebagai bahan baku obat modern, diantaranya pemanfaatan sambiloto sebagai obat HIV dan anti kanker.

Semua bagian tanaman sambiloto, seperti daun, batang, bunga dan akar, terasa sangat pahit jika dimakan atau direbus untuk diminum. Rasa pahit itu disebabkan oleh adanya senyawa andrographolid yang banyak terdapat di dalam tanaman sambiloto, terutama bagian daun dan batangnya. Dari penelitian terdahulu kadar senyawa andrographolid di daun sebesar 2,5 – 4,8% dari berat keringnya (Prapanza dan Marianto, 2003).

Kultur jaringan telah sejak lama digunakan sebagai salah satu metode untuk produksi senyawa bioaktif dari tumbuhan. Pada tahun 1957, Skoog dan Miller mengemukakan bahwa regenerasi tunas dan akar *in vitro* dikontrol secara hormonal oleh sitokinin dan auksin. Jika diberikan dalam jumlah yang seimbang, sitokinin dan auksin akan mendorong pembentukan kalus (Yusnita, 2003).

Penambahan auksin dalam jumlah yang lebih besar, atau penambahan auksin yang lebih stabil, seperti NAA cenderung menyebabkan terjadinya pertumbuhan kalus dari eksplan dan

menghambat regenerasi pucuk tanaman (Wetherell, 1982). Kinetin merupakan sitokinin sintetik yang mempunyai aktivitas yang lebih tinggi dari pada sitokinin alami⁶. Pembelahan sel dalam kultur jaringan tanaman yang disebabkan oleh kinetin telah banyak dilakukan penelitian oleh para ahli. Jumlah auksin dan sitokinin yang perlu ditambahkan kedalam kultur tergantung kandungan auksin dan sitokinin endogen pada eksplan. Oleh karena itu untuk mendapatkan komposisi auksin dan sitokinin yang tepat untuk menginduksi kalus perlu dilakukan penelitian.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan mulai bulan April sampai November 2012 bertempat di Laboratorium Kultur Jaringan Fakultas Pertanian Universitas Muria Kudus. Bahan meliputi eksplan kotiledon sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.) berasal dari bibit asal benih steril sambiloto *in vitro*, media MS, zat pengatur tumbuh NAA dan Kinetin. Alat meliputi Laminar Air flow Cabinet, Entkas, botol wadah media, cawan petri, autoklaf, pinset, gunting, skalpel, lampu bunsen, botol semprot untuk alkohol. Penelitian dilaksanakan dengan menggunakan percobaan faktorial yang berpola dasar pada Rancangan Acak Lengkap yang terdiri dari dua faktor dan lima ulangan, yaitu:

Faktor pertama adalah zat pengatur tumbuh NAA terdiri atas tiga aras:

N₀ : 0,0 ppm

N₁ : 0,5 ppm

N₂ : 1,0 ppm

Faktor kedua adalah zat pengatur tumbuh Kinetin terdiri atas empat aras:

K₀ : 0,0 ppm

K₁ : 0,5 ppm

K₂ : 1,0 ppm

Setiap perlakuan diulang sepuluh kali, sehingga secara keseluruhan terdapat 90 botol kultur. Pengamatan dilakukan terhadap parameter:

1. Saat Muncul kalus dengan cara eksplan diamati dan dicatat saat muncul kalus.
2. Warna kalus
3. Struktur kalus
4. Tekstur kalus, diamati saat akhir penelitian dengan menggunakan pinset untuk melihat teksturnya remah atau padat
5. Bobot kalus, diukur saat akhir penelitian.

Pada penelitian ini data hasil penelitian kuantitatif dianalisis menggunakan sidik ragam (*Analisis of Variance/ANOVA*) kemudian dilanjutkan dengan uji jarak berganda Duncan (*Duncan's Multiple Range Test*) pada jenjang nyata 5%, sedangkan pada parameter struktur, tekstur dan warna kalus dilakukan analisis secara diskriptif, yaitu dengan identifikasi secara kualitatif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini tidak terlepas dari terjadinya kontaminasi. Jumlah botol yang terkontaminasi adalah sebanyak 33,33%. Eksplan atau kultur terkontaminasi oleh berbagai mikroorganisme seperti jamur dan bakteri yang terjadi pada saat pemeliharaan kultur. Pencegahan kontaminasi telah dilakukan dengan cara sterilisasi lingkungan kerja, yaitu penyemprotan menggunakan formalin 30% dan alkohol 70%.

Pembentukan kalus pada kultur jaringan dipengaruhi oleh zat pengatur tumbuh. Pada penelitian ini digunakan media Murashige-Skoog (MS) dengan penambahan dua macam zat pengatur tumbuh, yaitu asam NAA dari golongan auksin dan Kinetin dari golongan sitokinin. Menurut berbagai pustaka, NAA merupakan hormon auksin sintesis yang paling efektif untuk pembentukan kalus sehingga disebut dengan "hormon dediferensiasi" (Endress, 1994). Zat pengatur tumbuh yang sering digunakan untuk membentuk kalus adalah kinetin yang merupakan hormon golongan sitokinin.

Respon pertumbuhan awal dari potongan kotiledon *Andrographis paniculata* Nees. yang ditanam dalam media MS padat mulai tampak pada hari ke-6 yang ditandai dengan melengkungnya eksplan kotiledon. Kalus mulai muncul pada hari ke-10, dimulai dari pinggir eksplan yang dilukai/bekas potongan kemudian pada bagian pinggir kotiledon dan kalus akhirnya menutupi hampir seluruh permukaan kotiledon pada akhir minggu ke-4. Pelukaan jaringan tumbuhan dapat merangsang pembentukan sel yang berperan dalam inisiasi pembentukan kalus. Sedangkan pembentukan kalus pada pinggir kotiledon dikarenakan adanya jaringan parenkhim (kambium) yang bersifat maristematis, sehingga sel-selnya masih aktif melakukan pembelahan².

Parameter Kedinian Terbentuknya Kalus (Hst)

Hasil dan analisis keragaman terhadap kedinian terbentuknya kalus dengan perlakuan kombinasi zat pengatur tumbuh NAA dan kinetin disajikan pada tabel lampiran 1. Hasil analisis keragaman menunjukkan bahwa zat pengatur tumbuh NAA berpengaruh sangat nyata terhadap kedinian terbentuknya kalus eksplan potongan daun sambiloto dan tidak ada interaksi antar kedua zat pengatur tumbuh yang dicobakan. Rerata kedinian terbentuknya kalus disajikan pada tabel 1.

Tabel 1. Hasil Analisis DMRT 5% Rerata Kedinian Kalus (Hst)

	N0	N1	N2	Rerata
K1	0.00i	14.80h	7.60h	7.47d
K2	0.00i	7.80h	9.60h	5.80d
K3	0.00i	7.40h	8.60h	5.33d
Rerata	0.00b	10.1a	8.80a	

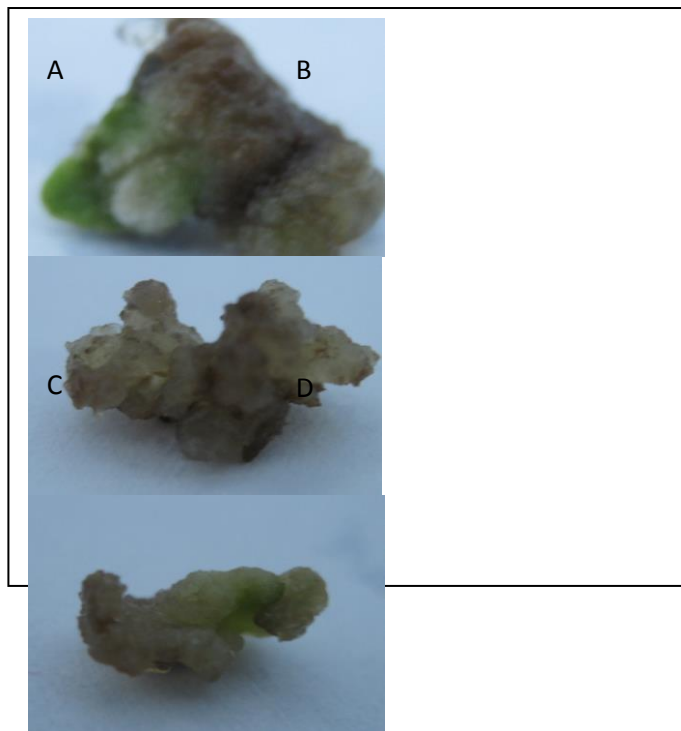
Parameter Bobot Kalus Segar

Hasil dan analisis keragaman terhadap bobot kalus segar dengan perlakuan kombinasi zat pengatur tumbuh asam 2,4-D dan kinetin disajikan pada tabel lampiran 2. Hasil analisis keragaman menunjukkan bahwa zat pengatur tumbuh asam 2,4-D berpengaruh sangat nyata terhadap bobot kalus segar eksplan potongan daun sambiloto dan tidak ada interaksi antar kedua zat pengatur tumbuh yang dicobakan. Rerata bobot kalus segar disajikan pada tabel 2.

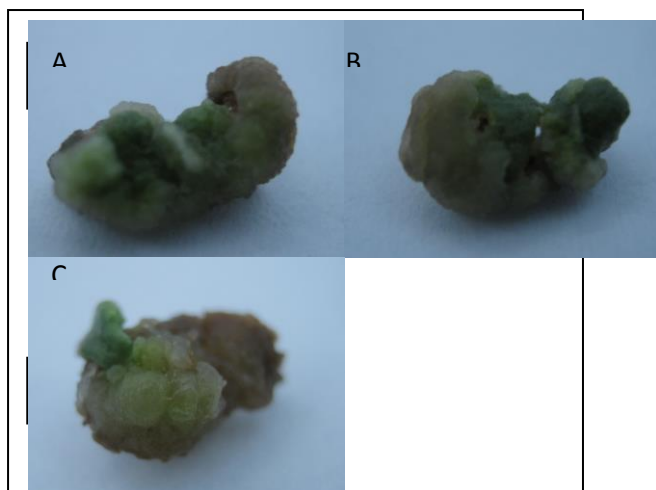
Tabel 2. Hasil Analisis DMRT 5% Rerata Bobot Kalus Segar (g)

	D0	D1	D2	Rerata
K1	0.00j	0.33hi	0.23hi	0.19d
K2	0.00j	0.19ij	0.29hi	0.16d
K3	0.00j	0.19hij	0.22hij	0.14d
Rerata	0.00b	0.27a	0.25a	

Pada gambar 4 tampak eksplan dengan perlakuan media tanpa zat pengatur tumbuh NAA dengan kombinasi berbagai konsentrasi Kinetin, terlihat tidak terbentuk kalus, kotiledon tetap hijau menebal, melengkung, selain pada perlakuan kontrol eksplan menjadi kering. Pada gambar 5 dan 6 terlihat eksplan dengan perlakuan NAA 0,1 ppm dan 0,2 ppm dengan kombinasi berbagai konsentrasi kinetin, terbentuk kalus yang kompak dengan berbagai bentuk dan variasi warna.



Gambar 5. A=N1K0; B=N1K1; C=N1K2



Gambar 6. A=N2K0; B=N2K1; C=N2K2

Hasil pengamatan secara visual pada kalus menunjukkan tekstur kalus yang kompak, sehingga jika ditekan kalus terasa keras. Pada kalus kompak ini ikatan sel satu dan yang lainnya rapat dan kompak. Pengamatan pada warna kalus pada penelitian ini ada sedikit variasi perbedaan warna, variasi warna sangat

mungkin muncul dalam kultur kalus sebagai akibat metabolisme sel fungsi genetik pada bagian tertentu dari eksplan yang ditanam².

KESIMPULAN

Perbedaan konsentrasi zat pengatur tumbuh NAA dan kinetin memberikan pengaruh berbeda terhadap pertumbuhan kalus eksplan potongan kotiledon sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.).

DAFTAR PUSTAKA

1. Dixon, R.A. 1985. *Plant Cell Culture A Practical Approach*. Washington DC: Department of Biochemistry, Royal Holloway College. IRL Press Oxford.
2. George, E.F.; and P.D. Sherington. 1984. *Plant Propagation by Tissue Culture*. Exegetics Limited. Eversley, Basingstoke, England.
3. Gopi,C. and T.M. Vatsala. 2006. In vitro Studies on Effects of Plant Growth Regulators on Callus and Suspension Culture Biomass Yield from *Gynema sylvestre* R.Br. *African Journal of Biotechnology Vol. 5 (12), pp. 1215-1219*.
4. Gunawan, L.W. 1990. *Teknik Kultur Jaringan Tumbuhan*. Laboratorium Kultur Jaringan. IPB.
5. Mungole,A, R. Awati, S. Dey, A. Chaturvedi and P. Zanwar. 2009. In-vitro Callus Induction and Shoot Regeneration in *Ipomoea obscura* (L.): potent Indian Medicinal Plant. *Indian Journal of Science and Technology* 2(8):19-23.
6. Santoso, U. dan F. Nursandi. 2004. *Kultur Jaringan Tanaman*. Universitas Muhammadiyah Malang. UMM-Press.
7. Sengupta, J. dan Mitra, G.C.1989. Steroid Formation During Morphogenesis in Callus Cultures of *Dioscorea floribunda*. *J.of Plant Physiol.*135(1):27-30.
8. Suryowinoto, M. 1996. *Pemuliaan Tanaman Secara In Vitro*. Yogyakarta: Kanisius.
9. Syarifah I.A., Surjono H., Sutjahjo, Rustikawati dan Catur Herison. 2007. Induksi Kalus Embriogenik Pada Kultur In Vitro Jagung (*Zea mays* L.) Dalam Rangka Peningkatkan Keragaman Genetik Melalui Variasi Somaklonal. *Jurnal Ilmu-Ilmu Pertanian Indonesia*. Edisi Khusus, No. 3(344 – 350).

10. Verpoorte, R. and A.W. Alfermann. 2000. *Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolism*. Kluwer Academic Publisher. p 3-30
11. Widowati, L. 2003. Penyediaan Granul Ekstrak Sambiloto sebagai Fitofarmaka Antidiabetik Oral. http://digilib.litbang.depkes.go.id/go.php?no_de=0 Yogyakarta. Hal. 18, 54, 57, 63, 67, 69, 82-83. Diunduh tanggal 16 April 2008.
12. Yusron, M.; M. Januwati dan E. Rini Pribadi. Budidaya Tanaman Sambiloto. 2005. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatika. Homepage : <http://www.balittro.go.id>. Sirkuler No. 11, 2005.