

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pengaruh Jenis Eksplan dan Konsentrasi ZPT 2,4-D terhadap Pertumbuhan dan Perkembangan Kalus Purwoceng (*Pimpinella alpina* Molk.)

4.1.1 Pembentukan (Hari) Kalus dan Persentase Eksplan Berkalus

Sumber eksplan yang digunakan pada tahap inisiasi kalus pada kultur kalus Purwoceng (*Pimpinella alpina* Molk), yaitu daun muda yang membuka sempurna dan tangkai daun (petiol) yang berasal dari tumbuhan Purwoceng liar. Insisiasi kalus yang terjadi pada penelitian ini mulai terlihat pada hari ke lima, dengan ditandai pembengkakan pada eksplan kemudian kalus muncul. Data hari pembentukan kalus dapat diamati dalam Lampiran 8.

Berdasarkan hasil penelitian dan *Analysis of Variance* (ANOVA) tentang pengaruh jenis eksplan dan konsentrasi 2,4-D terhadap pembentukan (hari) eksplan berkalus, diperoleh data pada perlakuan jenis eksplan menunjukkan signifikansi $< 0,05$. Hal ini menunjukkan bahwa ada pengaruh jenis eksplan terhadap berat kalus Purwoceng, sedangkan konsentrasi dan interaksi antara jenis eksplan dengan konsentrasi 2,4-D tidak menunjukkan perbedaan yang nyata.

Untuk mengetahui perbedaan pengaruh jenis eksplan terhadap pembentukan (hari) kalus muncul, maka perlu dilakukan uji lanjut dengan menggunakan uji DMRT 5%. Berdasarkan hasil uji DMRT 5% dari hari kalus, maka di dapatkan notasi DMRT seperti pada tabel 4.1.

Tabel 4.1 Pengaruh Jenis Eksplan terhadap Hari Muncul Kalus (HST)

No	Jenis Eksplan	Hari Muncul Kalus (HST)
1.	Daun	15 b
2.	Petiol	11,33 a

Berdasarkan Table 4.1 menunjukkan bahwa pembentukan (hari) kalus perlakuan petiol berbeda nyata dengan perlakuan daun. Hal ini menunjukkan bahwa jenis eksplan mempengaruhi terjadinya inisiasi kalus, tetapi perlakuan beberapa konsentrasi 2,4-D tidak menunjukkan pengaruh terhadap inisiasi kalus.

Hasil penelitian dan *Analysis of Variance* (ANOVA) tentang pengaruh jenis eksplan dan konsentrasi 2,4-D terhadap persentase eksplan berkalus diperoleh data pada perlakuan konsentrasi 2,4-D menunjukkan bahwa signifikansi $< 0,05$. Hal ini menunjukkan bahwa ada pengaruh konsentrasi 2,4-D pada media terhadap berat kalus Purwoceng, sedangkan jenis eksplan dan interaksi antara jenis eksplan dengan konsentrasi 2,4-D tidak menunjukkan perbedaan yang nyata. Hasil ini dapat dilihat pada lampiran 12.

Untuk mengetahui perbedaan pengaruh pemberian berbagai macam konsentrasi 2,4-D terhadap persentase eksplan berkalus, maka perlu dilakukan uji lanjut dengan menggunakan uji DMRT 5%. Berdasarkan hasil uji DMRT 5% dari persentase eksplan berkalus, maka di dapatkan notasi DMRT seperti pada tabel 4.2.

Tabel 4.2 Pengaruh Konsentrasi ZPT 2,4-D terhadap Persentase Eksplan Berkalus

No.	Konsentrasi 2,4-D (mg/l)	Persentase Eksplan Berkalus (%)
1.	0	.0000 a
2.	2	60.6333 b
3.	4	75.0000 b
4.	6	68.6267 b

Keterangan: Angka yang didampingi adalah huruf yang sama pada kolom yang bersesuaian menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji DMRT pada taraf $\alpha = 0.05$
Data di atas merupakan merupakan hasil dari transformasi Arcsin (transformasi sudut)

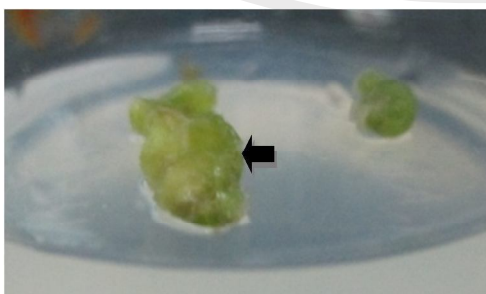
Berdasarkan Table 4.2 hasil persentase eksplan berkalus menunjukkan perlakuan konsentrasi 4 mg/l berbeda nyata dengan konsentrasi 0 mg/l tetapi tidak berbeda nyata dengan konsentrasi 2 mg/l, dan 6 mg/l, dengan demikian pemberian konsentrasi 2,4-D tidak memberikan perbedaan yang signifikan terhadap persentase eksplan berkalus.

Data tabel 4.1 menunjukkan bahwa pada hari pertama setelah tanam, semua eksplan belum menunjukkan munculnya kalus. Hari ke lima eksplan daun dari konsentrasi 2,4-D 2 mg/l, 4 mg/l dan 6 mg/l mulai menggulung, kemudian pada hari ke tujuh eksplan semakin besar dan membengkak tapi belum muncul kalus. Pada eksplan petiol, pada hari ke enam petiol konsentrasi 2,4-D 2 mg/l, 4 mg/l dan 6 mg/l mulai membengkak dan pecah. Sedangkan pada konsentrasi 0 mg/l dari eksplan daun maupun petiol belum menunjukkan perubahan.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada perlakuan tanpa 2,4-D (0 mg/l) pada eksplan daun maupun petiol tidak muncul kalus. Hal ini

disebabkan kerana hormon auksin endogen yang ada dalam eksplan tersebut belum mampu untuk menginduksi kalus.

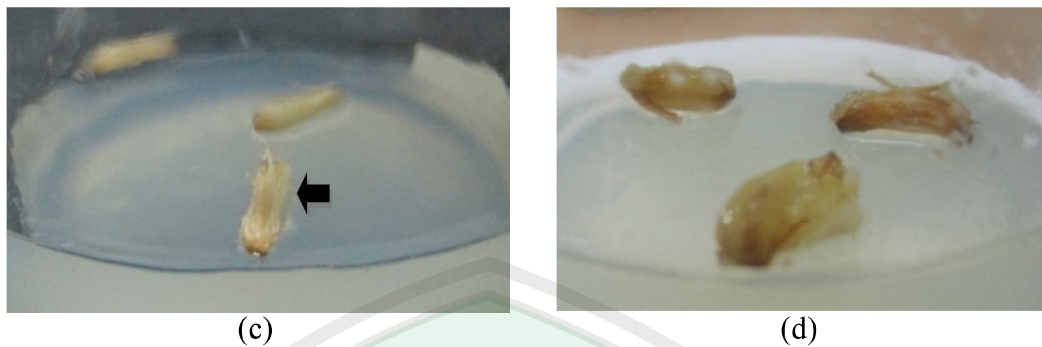
Perlakuan jenis eksplan dan konsentasi 2,4-D mampu menginduksi terbentuknya kalus. Hal ini terlihat pada perlakuan konsentasi 2,4-D 2 mg/l eksplan daun mulai muncul kalus rata-rata pada 16,3 hari setelah tanam (HST), konsentasi 2,4-D 4 mg/l membentuk kalus rata-rata pada 12 HST dan konsentasi 2,4-D 6 mg/l muncul kalus rata-rata pada 16,7 HST (Lampiran 8). Munculnya kalus mula-mula diawali dengan eksplan daun mulai menggulung kemudian membengkak dan semakin besar. Kalus muncul dimulai dari bagian pada bagian luka bekas irisan sampai semua eksplan menjadi kalus semua kemudian berlanjut dengan pertumbuhan kalus sebagai akibat dari proliferasi sel-sel penyusun kalus. Inisiasi kalus dapat kalus dapat dilihat pada (Gambar 4.1). Terbentuknya kalus merupakan akibat dari pelukaan pada permukaan eksplan dan pengaruh perlakuan zat pengatur tumbuh yang diberikan pada medium kultur (Zulkarnain, 2009). Utami *et al.* (2007), yang menyatakan bahwa terjadinya kalus ditempat irisan bertujuan untuk menutup luka.



(a)



(b)



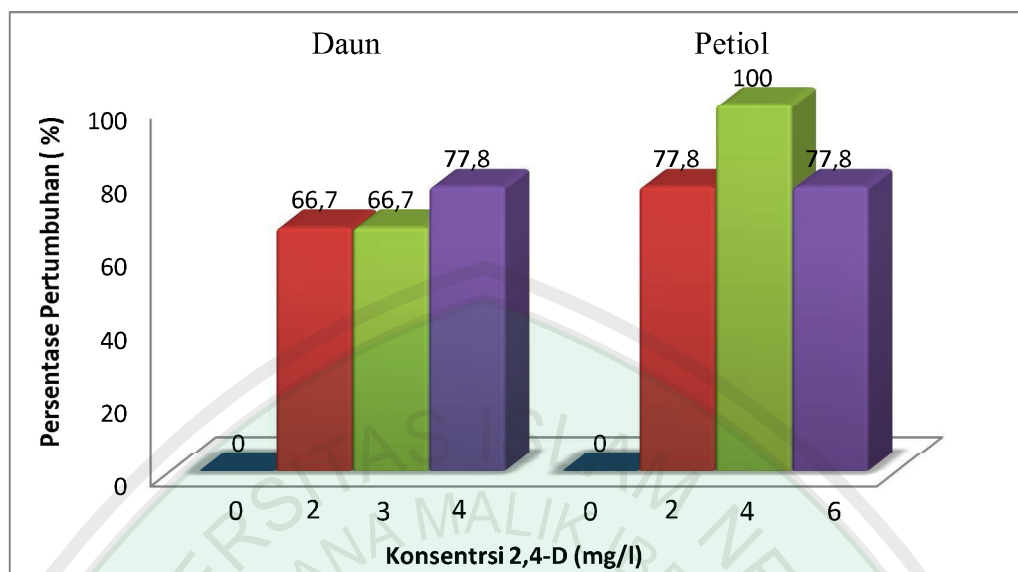
Gambar 4.1 Pembentukan kalus Purwoceng (*Pimpinella alpina* Molck.) (a) kalus awal pada eksplan daun, (b) kalus minggu kedelapan pada eksplan daun, (c) kalus awal pada eksplan petiol, (d) kalus minggu kedelapan eksplan petiol; Tanda ← menunjukkan munculnya kalus

Perlakuan eksplan tangkai daun (petiol) konsentrasi 2,4-D 2 mg/l mulai muncul kalus rata-rata pada 12,7 hari setelah tanam (HST), konsentrasi 2,4-D 4 mg/l membentuk kalus rata-rata pada 10 HST dan konsentrasi 2,4-D 6 mg/l muncul kalus rata-rata pada 11,3 HST, sehingga perlakuan yang paling cepat muncul kalus yaitu pada konsentrasi 2,4-D 4 mg/l pada eksplan petiol (Lampiran 8). Munculnya kalus pada eksplan petiol mula-mula diawali dengan eksplan mulai membengkak, bagian luar dari petiol pecah (epidermis mengelupas) sehingga terjadi luka kemudian muncul kalus pada bagian luka untuk menutupi luka tersebut. Proses inisiasi kalus dapat dilihat pada (Gambar 4.1).

Pembentukan kalus pada ujung eksplan diawali dengan membesarnya sel-sel epidermis bagian atas kemudian sel-sel tersebut membelah menjadi dua (Krisnamoorthy, 1981 dalam Astutik, 2007). Menurut Evans *et, al.* (2003), menyebutkan bahwa ketika tanaman dilukai maka kalus akan terbentuk akibat selnya mengalami kerusakan dan terjadi *outolisis*

(pemecahan), dan dari sel yang rusak tersebut dihasilkan senyawa-senyawa yang merangsang pembelahan sel di lapisan berikutnya sehingga terbentuk gumpalan sel-sel yang terdeferensiasi.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi pemberian zat pengatur tumbuh 2,4-D memberikan pengaruh yang berbeda terhadap pembentukan kalus tetapi tidak memberikan pengaruh yang signifikan dari beberapa perlakuan. Perbedaan pengaruh ini dapat dilihat dari persentase eksplan yang membentuk kalus dari masing-masing perlakuan. Perlakuan tanpa zat pengatur tumbuh 2,4-D (0 mg/l) tidak ada yang muncul kalus baik dari eksplan daun maupun petiol, sehingga persentase membentuk kalus 0 %. Eksplan daun pada konsentrasi 2,4-D 2 mg/l 66,7 %, konsentrasi 2,4-D 4 mg/l 66,7 %, konsentrasi 2,4-D 6 mg/l 77,8 %. Sedangkan eksplan petiol pada konsentrasi pada 2,4-D 2 mg/l 77,8 %, konsentrasi 2,4-D 4 mg/l 100 %, konsentrasi 2,4-D 6 mg/l 77,8 %. Hasil tersebut menunjukkan bahwa konsentrasi 2,4-D 4 mg/l tidak berbeda nyata dengan perlakuan yang lain tetapi mampu menghasilkan persentase pembentukan kalus tertinggi, sehingga konsentrasi 2,4-D 4 mg/l efektif untuk menginduksi kalus. Hal ini dapat dilihat pada (Lampiran 6).



Gambar 4.2 Persentase Pertumbuhan kalus Purwoceng (*Pimpinella alpina* Molk.) pada beberapa konsentrasi perlakuan

Perbedaan jenis eksplan dan konsentrasi 2,4-D menunjukkan pengaruh terhadap persentase pembentukan kalus. Menurut Fatimah (2011), pertumbuhan dan morfogenesis dalam mikropropagasi sangat dipengaruhi oleh keadaan jaringan tanaman yang digunakan sebagai eksplan. Selain faktor genetis eksplan yang telah disebutkan di atas, kondisi eksplan yang mempengaruhi keberhasilan teknik mikropropagasi adalah jenis eksplan, ukuran, umur dan fase fisiologis jaringan yang digunakan sebagai eksplan. Meskipun masing-masing sel tanaman memiliki kemampuan totipotensi, namun masing-masing jaringan memiliki kemampuan yang berbeda-beda untuk tumbuh dan beregenerasi dalam kultur jaringan.

Auksin dan sitokinin yang cukup dan seimbang dibutuhkan dalam kultur *in vitro*. Salisbury dan Ross (1995), menyatakan bahwa fungsi utama dari sitokinin yaitu memacu pembelahan sel. Apabila batang atau bagian dari

tanaman dikotil dipisahkan dan dibiakkan secara aseptik pada media agar yang mengandung auksin (2,4-D) dan hara yang tepat, akan membentuk massa sel yang tidak terspesialisasi, tak beraturan, dan khususnya poliploid yang disebut dengan kalus.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi 2,4-D 4 mg/l mampu menginduksi kalus tercepat dan persentase tertinggi. Hal ini disebabkan karena zat pengatur tumbuh tersebut dapat memacu proses metabolisme yang ada pada eksplan tersebut. Tetapi pada konsentrasi 2,4-D 2 mg/l dan 2,4-D 6 mg/l menunjukkan hasil yang kurang optimal, ini disebabkan pada konsentrasi 2,4-D 2 mg/l terlalu rendah sehingga kurang dapat memacu pembentukan kalus sedangkan pada konsentrasi 2,4-D 6 mg/l terlalu tinggi sehingga pertumbuhan kalus juga terhambat karena semakin tinggi konsentrasi dapat menyebabkan toksisitas pada sel tersebut. Hal ini sesuai dengan yang dikemukakan oleh Gati dan Mariska (1992), 2,4-D efektif untuk memacu pembentukan kalus karena aktivitasnya yang kuat untuk memacu proses dediferensiasi sel, menekan organogenesis serta menjaga pertumbuhan kalus.

Petiol memberikan respon munculnya kalus tercepat karena susunan jaringan yang ada pada petiol mudah terurai sehingga pertumbuhannya relatif lebih cepat. Menurut Harahap (2005), pada kultur kalus tanaman pegagan (*Centella asiatica* L.) yang berasal dari tangkai daun diperoleh bahwa waktu muncul kalus yang paling cepat adalah satu minggu setelah tanam. Hasil penelitiannya juga menunjukkan bahwa kultur kalus tanaman pegagan (*Centella asiatica* L.) ditemukan pertumbuhan dan perkembangan kalus yang

baik pada kalus yang berasal dari jaringan tangkai daun, sedangkan pertumbuhan dan perkembangan kalus yang berasal dari jaringan daun cenderung lambat.

4.1.2 Morfologi Kalus Purwoceng (*Pimpinella alpina* Molk)

4.1.2.1 Warna dan Tekstur Kalus Purwoceng (*Pimpinella alpina* Molk)

Variabel warna kalus diamati setiap dua minggu hingga pada akhir pengamatan. Pada awal penanaman kalus mempunyai warna putih. Hasil pengamatan menunjukkan adanya perbedaan warna kalus. Perbedaan warna kalus menunjukkan tingkat perkembangan dari kalus. Kualitas kalus yang baik memiliki warna putih dimana pertumbuhan atau pembelahannya lebih cepat. Semakin coklat maka semakin banyak sel yang tua sehingga pertumbuhannya lambat. Selain itu, warna kalus juga mengindikasikan keberadaan klorofil dalam jaringan, semakin hijau warna kalus semakin banyak pula kandungan klorofilnya. Warna terang atau putih dapat mengindikasikan bahwa kalus masih cukup baik (Fatmawati, 2008). Dengan demikian warna kalus juga dapat diketahui apakah suatu kalus masih memiliki sel-sel yang aktif membelah atau masih hidup ataukah telah mati. Tabel perubahan morfologi kalus dapat dilihat pada (tabel 4.3). Morfologi kalus Purwoceng (*Pimpinella alpina* Molk.) disajikan pada (Gambar 4.3).

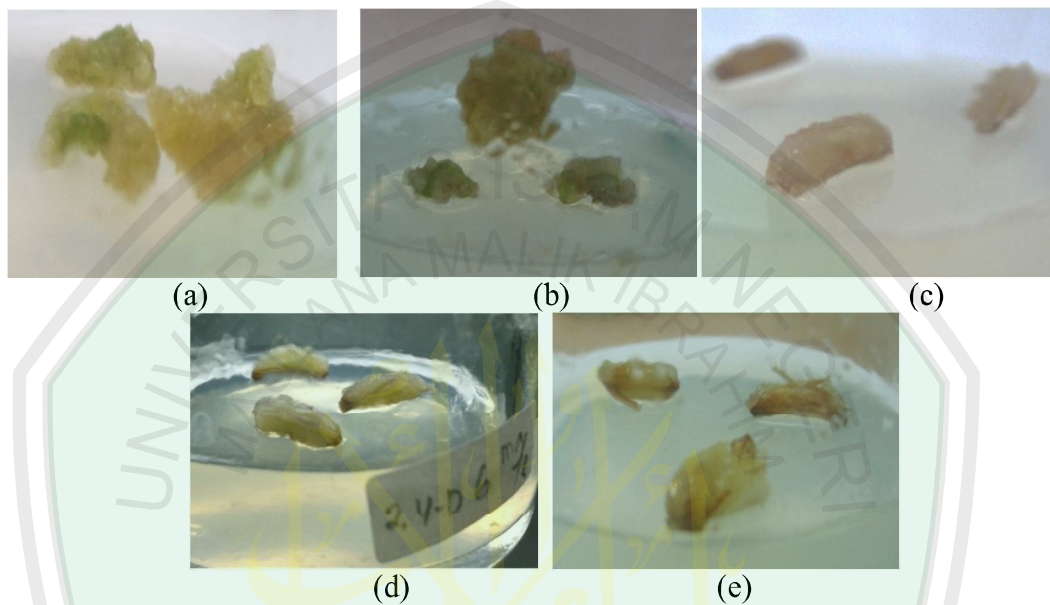
Tabel 4.3 Perubahan Morfologi Kalus Purwoceng (*Pimpinella alpina* Molk.) Pada Media Media MS dengan Konsentrasi 2,4-D dan Jenis Eksplan

Eksplan	Perlakuan 2,4-D	Warna Kalus		Tekstur Kalus	
		Minggu kedua	Minggu kedelapan	Minggu kedua	Minggu kedelapan
Daun	0 mg/l	-	-	-	-
	2 mg/l	Hijau	Hijau kekuningan	Kompak	Kompak
	4 mg/l	Hijau	Hijau agak kecoklatan	Kompak	Kompak
	6 mg/l	Hijau	Hijau kekuningan	<i>Intermediet</i> (semi remah)	<i>Intermediet</i> (semi remah)
Petiol	0 mg/l	-	-	-	-
	2 mg/l	Putih bening	Putih	Kompak	Kompak
	4 mg/l	Hijau kekuningan	Kuning kecoklatan	Kompak	Kompak
	6 mg/l	Hijau	Hijau kekuningan	Kompak	Kompak

Penambahan zat pengatur tumbuh 2,4-D pada kultur *in vitro* yang menggunakan eksplan daun dan petiol Purwoceng (*Pimpinella alpina* Molk.) dengan konsentrasi 2,4-D 0 mg/l, 2 mg/l, 4 mg/l dan 6 mg/l memberikan pengaruh yang bervariasi. Eksplan daun dengan 2,4-D 2 mg/l pada media MS menghasilkan kalus berwarna hijau setelah dua minggu tanam. Warna kalus berubah menjadi hijau kekuningan pada pengamatan minggu keempat, keenam dan minggu kedelapan.

Eksplan daun yang ditanam pada media MS dengan 2,4-D konsentrasi 4 mg/l pada minggu kedua menghasilkan kalus berwarna hijau, pada minggu keempat dan minggu ke enam kalus mengalami perubahan warna hijau kekuningan dan pada minggu kedelapan warna kalus menjadi hijau agak kecoklatan, sedangkan eksplan pada 2,4-D 6 mg/l menghasilkan kalus

berwarna hijau setelah dua minggu tanam dan pada pengamatan minggu keempat menjadi hijau kekuningan. Pada minggu keempat dan minggu kedelapan warna kalus tidak mengalami perubahan.



Gambar 4.3 Warna kalus Purwoceng (*Pimpinella alpina* Molk.) (a). warna hijau kekuningan pada daun, (b) warna hijau agak kecoklatan pada daun, (c). warna putih pada petiol, (d) warna kuning kecoklatan pada petiol, (e). warna hijau kekuningan pada petiol

Eksplan petiol yang ditanam pada media MS dengan penambahan zat pengatur tumbuh 2,4-D konsentrasi 2 mg/l menghasilkan kalus berwarna rata-rata berwarna putih bening pada minggu kedua, minggu keempat dan kedelapan kalus tetap berwarna putih. Warna tersebut menandakan bahwa kalus tersebut tumbuh dengan baik. 2,4-D konsentrasi 4 mg/l menghasilkan kalus dengan warna hijau kekuningan, hingga kuning kecoklatan. Eksplan petiol yang ditanam pada konsentrasi 2,4-D 6 mg/l menghasilkan warna kalus yang rata-rata pada minggu kedua berwarna hijau kemudian minggu keempat

berwarna hijau kekuningan sampai minggu kedelapan warna kalus tetap hijau kekuningan.

Perubahan warna kalus ini disebabkan karena kalus tersebut semakin tua (mengalami penuaan), selain itu juga dapat terjadi karena nutrisi yang ada semakin sedikit sehingga terjadi persaingan dalam mendapatkan nutrisi sehingga sebagian dari sel tersebut ada yang mengalami kematian. Biasanya pertumbuhan yang cepat dan warna kalus yang cenderung terang mengindikasikan bahwa kondisi kesehatan kultur tersebut cukup baik. Sedangkan warna coklat hingga hitam secara umum menunjukkan keadaan kalus yang sel-selnya telah mati. Ariningsih (2002), semakin lama kalus ditanam pada media perlakuan, warnanya semakin coklat tua bahkan cenderung coklat kehitaman dan muncul kalus muda yang berwarna kuning bening (*yellowish*) dengan tekstur kompak.

Terbentuknya warna kalus dipengaruhi oleh adanya zat pengatur tumbuh auksin dan sitokinin. Seperti yang dinyatakan oleh Santoso dan Nursandi (2004), bahwa dalam aktivitas kultur jaringan, auksin sangat dikenal sebagai hormon yang menghambat kerja sitokinin membentuk klorofil dalam kalus, sedangkan hormon sitokinin berfungsi mendorong pembentukan klorofil pada kalus.

Selain berpengaruh pada proliferasi kalus, warna kalus juga mempengaruhi produksi metabolit sekunder. Kalus berwarna putih menandakan bahwa kandungan stigmasterol dan sitosterol yang rendah sedangkan kalus yang berwarna hijau kekuningan kandungan stigmasterol

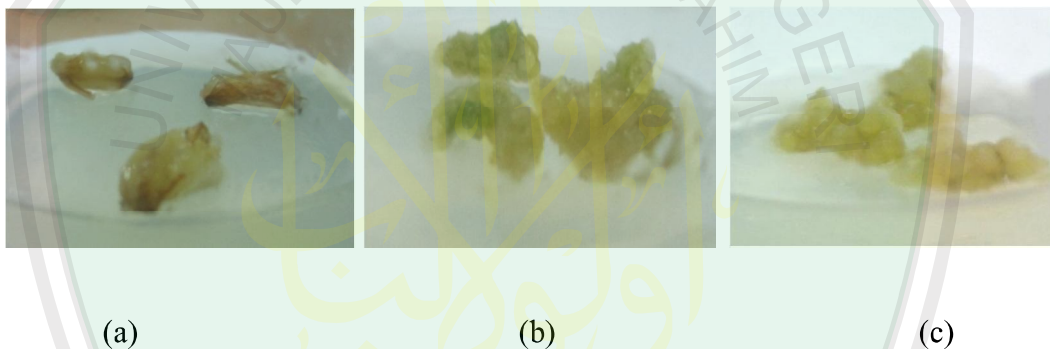
dan sitosterolnya lebih tinggi, dengan demikian bahwa semakin gelap warna kalus maka semakin tinggi produksi metabolit sekunder yang dihasilkan. Pencoklatan pada jaringan terkait dengan akumulasi fenol yang berlebihan. Menurut Wickremesinhe dan Arteca (1993) dalam Harahap (2005), terjadinya perubahan warna kalus menjadi kecoklatan, kemungkinan besar karena pertumbuhan dan perkembangan kalus tersebut telah memasuki fase stasioner (penuaan). Pada umumnya senyawa metabolit sekunder mulai dibentuk pada awal fase stasioner, sehingga semakin gelap warna kalus maka semakin tinggi kadar metabolit sekunder yang dihasilkan.

Turhan (2004), menyatakan bahwa tekstur kalus dapat dibedakan menjadi tiga macam, yaitu: kompak (*non friable*), intermediet dan remah (*friable*). Syahid (2010), penggunaan 2,4-D secara tunggal pada semua konsentrasi yang diaplikasikan menghasilkan kalus dengan struktur sebagian remah (*friable*) dan sebagian kompak. Kalus dengan struktur remah (*friable*) merupakan kalus yang terbentuk dari sekumpulan sel yang mudah lepas sedangkan kalus kompak terdiri dari sekumpulan sel yang kuat.

Menurut Purwianingsih (2007), struktur kalus yang kompak dan terjadinya perubahan warna kekuningan atau kehijauan, mengindikasikan terjadinya diferensiasi sel. Kalus kompak ini terjadi melalui proses pertumbuhan yang mengarah pada pembentukan sel-sel yang berikatan rapat dan padat.

Tekstur kalus pada teknik kultur *in vitro* sangat dipengaruhi oleh jenis eksplan yang ditanam. Eksplan yang digunakan adalah daun dan tangkai daun

(petiol). Pada minggu ke-2 sampai minggu ke-8 setelah tanam, eksplan daun yang ditanam dengan menggunakan media MS dan 2,4-D 0 mg/l tidak menghasilkan kalus. 2,4-D 2 mg/l dengan eksplan daun membentuk kalus yang memiliki tekstur kompak. Kalus dengan tekstur kompak mempunyai susunan sel yang padat sehingga sulit dipisahkan. Konsentrasi 2,4-D 4 mg/l menghasilkan tekstur kalus rata-rata kompak. Sedangkan pada konsentrasi 2,4-D 6 mg/l menunjukkan rata-rata *intermediet* (semi remah). Tekstur kalus dapat dilihat pada (Tabel 4.2, Gambar 4.4 dan Lampiran 9).



Gambar 4.4 Tekstur Kalus Purwoceng (*Pimpinella alpina* Molck.) (a) Tekstur Kalus Kompak pada Petiol , (b) Tekstur Kalus Intermediet pada Daun, (c) Tekstur Kalus Kompak pada Daun

Eksplan petiol yang ditanam pada media MS dengan 2,4-D 0 mg/l tidak menghasilkan kalus, sedangkan eksplan petiol yang ditanam pada media MS dengan penambahan 2,4-D 2 mg/l, 4 mg/l dan 6 mg/l menghasilkan kalus dengan tekstur kompak. Kalus yang muncul berupa kumpulan sel-sel dengan jumlah banyak, padat dan mengandung air. Kalus dengan tekstur kompak yang terbentuk memiliki ciri-ciri antara satu sel dengan yang lain sulit dipisahkan karena sel mengumpul membentuk gumpalan yang kompak.

Berdasarkan hasil analisis Kromatografi Kolom (LC) kalus bertekstur kompak mempunyai kadar stigmasterol dan sitosterol yang lebih tinggi daripada kadar kalus bertekstur intermediet (semi remah). Menurut hasil penelitian Lindsey dan Yeoman (1983), kalus yang bertekstur remah umumnya akan mengakumulasi senyawa metabolit sekunder dalam jumlah sedikit dibandingkan dengan kalus yang bertekstur kompak. Hal ini disebabkan karena kalus yang bertekstur remah tingkat proliferasinya lebih tinggi (lebih banyak memproduksi metabolit primer) dari pada kalus yang bertekstur kompak. Kalus yang bertekstur remah lebih banyak menyerap nutrisi yang ada pada media sedangkan kalus yang bertekstur kompak lebih sedikit karena susunan sel pada kalus kompak rapat, padat dan sulit dipisahkan sehingga proses penyerapan nutrisi cenderung lebih sedikit sehingga menyebabkan kalus tersebut memproduksi metabolit sekunder yang lebih banyak untuk mempertahankan diri.

4.1.3 Berat Kalus

Berdasarkan hasil penelitian dan *Analysis of Variance* (ANOVA) tentang pengaruh jenis eksplan dan konsentrasi 2,4-D terhadap berat kalus, diperoleh data pada perlakuan konsentrasi yang menunjukkan bahwa signifikansi $< 0,05$. Hal ini menunjukkan bahwa ada pengaruh konsentrasi 2,4-D pada media terhadap berat kalus Purwoceng. Sedangkan jenis eksplan dan interaksi antara jenis eksplan dengan konsentrasi 2,4-D tidak menunjukkan perbedaan yang nyata. Hasil ini dapat dilihat pada lampiran 13.

Untuk mengetahui perbedaan pengaruh pemberian berbagai macam konsentrasi 2,4-D terhadap berat kalus, maka perlu dilakukan uji lanjut dengan menggunakan uji DMRT 5%. Berdasarkan hasil uji DMRT 5% dari rata-rata berat total kalus, maka di dapatkan notasi DMRT seperti pada tabel 4.4.

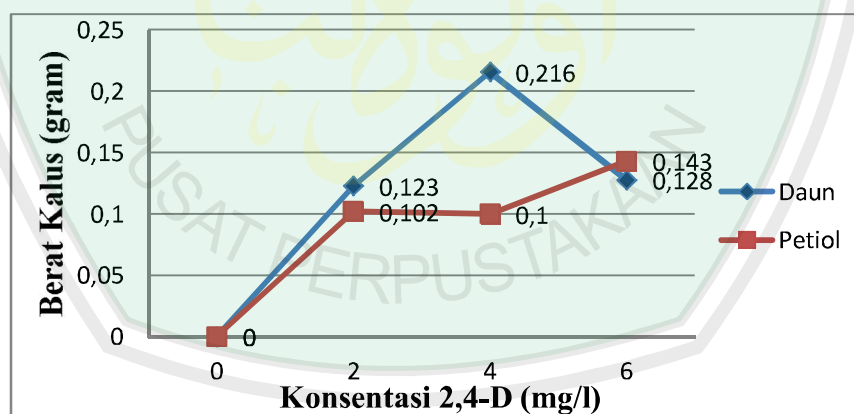
Tabel 4.4 Pengaruh Konsentrasi ZPT 2,4-D terhadap Berat Kalus (gram)

No.	Konsentrasi (mg/l)	Berat (gram)
1.	0	0.70711 a
2.	2	0.78068 b
3.	4	0.80913 b
4.	6	0.79559 b

Keterangan: Angka yang didampingi adalah huruf yang sama pada kolom yang bersesuaian menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji DMRT pada taraf $\alpha = 0.05$
Data di atas merupakan hasil dari transformasi akar

Berdasarkan Table 4.4 menunjukkan bahwa berat basah kalus perlakuan 2,4-D 4 mg/l berbeda nyata dengan perlakuan 2,4-D 0 mg/l, sedangkan dengan perlakuan 2,4-D 2 mg/l, 6 mg/l tidak berbeda nyata. Hasil penelitian menunjukkan bahwa berat kalus tertinggi yaitu eksplan daun pada konsentrasi 2,4-D 4 mg/l dengan berat rata-rata 0,216 g, petiol konsentrasi 2,4-D 6 mg/l dengan berat rata-rata 0,143 g, daun konsentrasi 2,4-D 6 mg/l dengan berat 0,128 g, kemudian diikuti daun konsentrasi 2,4-D 2 mg/l 0,123 g, petiol konsentrasi 2,4-D 2 mg/l 0,101 g dan berat terendah pada petiol konsentrasi 2,4-D 4 mg/l dengan berat rata-rata 0,1 g, sedangkan pada eksplan baik petiol maupun daun yang di tanam pada media kontrol 2,4-D 0 mg/l tidak muncul kalus sehingga berta kalus 0 mg/l (Lampiran 10).

Hasil tersebut menunjukkan bahwa eksplan daun pada konsentrasi 2,4-D 4 mg/l menunjukkan konsentrasi terbaik untuk membentuk kalus Purwoceng sedangkan pada eksplan petiol pada konsentrasi 2,4-D 6 mg/l. Berdasarkan hasil tersebut juga dapat diketahui bahwa semakin tinggi konsentrasi 2,4-D yang diberikan maka semakin tinggi berat kalus yang dihasilkan, karena zat pengatur tumbuh tersebut mempercepat proses metabolisme primer yang dilakukan oleh eksplan tersebut. Menurut Maftuchah dkk, (1998), di dalam sel, 2,4-D diduga mempengaruhi metabolisme RNA, yang mengontrol metabolisme protein, yang kemungkinan dilakukan pada proses transkripsi molekul RNA. Kenaikan sintesis protein menyebabkan bertambahnya sumber tenaga untuk pertumbuhan sehingga produksi kalus semakin meningkat. Rata-rata berat kalus disajikan dalam grafik Gambar 4.5.



Gambar 4.5 Grafik Berat Kalus pada Perbedaan Jenis Eksplan dan Konsentrasi 2,4-D Minggu Ke delapan Setelah Taman

Rahayu *et al.* (2003), berat basah yang dihasilkan sangat tergantung pada kecepatan sel-sel tersebut membelah diri, memperbanyak diri, dan dilanjutkan dengan membesarnya kalus. Zat pengatur tumbuh auksin dan

sitokinin yang diberikan pada perbandingan yang tepat dapat menginisiasi pembelahan sel dan meningkatkan pertumbuhan sel.

Menurut Wardani (2004), penambahan 2,4-D dalam media ternyata efektif untuk meningkatkan laju pertumbuhan kalus. Semakin tinggi konsentrasi 2,4-D yang ditambahkan semakin meningkatkan laju pertumbuhan kalus. Hal ini sesuai dengan penelitiannya pada kultur kalus *Talinum paniculatum* Gaertn yang menunjukkan semakin tinggi pemberian 2,4-D maka semakin berat kalus yang dihasilkan. Auksin berupa 2,4-D dapat menaikkan tekanan osmotik, meningkatkan permeabilitas sel terhadap air, menyebabkan pengurangan tekanan pada dinding sel, meningkatkan sintesis protein, meningkatkan plastisitas dan pengembangan dinding sel (Abidin, 1983).

Allah menciptakan segala sesuatu sesuai dengan ukuran atau takaran, sesuai dengan firman-Nya dalam Q.S Surat Al-Furqan/25:2 yang berbunyi:

الَّذِي لَهُ مُلْكُ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ وَلَمْ يَتَّخِذْ وَلَدًا وَلَمْ يَكُن لَّهُ شَرِيكٌ فِي الْمُلْكِ وَخَلَقَ كُلَّ شَيْءٍ فَقَدَرَهُ تَقْدِيرًا ﴿٢﴾

Artinya: “Yang kepunyaan-Nya-lah kerajaan langit dan bumi, dan Dia tidak mempunyai anak, dan tidak ada sekutu baginya dalam kekuasaan(Nya), dan Dia telah menciptakan segala sesuatu, dan Dia menetapkan ukuran-ukurannya dengan serapi-rapinya” (Q.S Al-Furqan/25:2).

Kata (خلق) diartikan *menciptakan* maksudnya Allah menciptakan yang asalnya tidak ada menjadi ada. Ayat diatas Allah menciptkan sesuatu itu sesuai dengan ukurannya yaitu, jadi segala sesuatu yang dijadikan Tuhan diberi-Nya perlengkapan-perengkapan dan persiapan-persiapan, sesuai

dengan naluri, sifat-sifat dan fungsinya masing-masing dalam hidup. Seperti halnya dengan zat pengatur tumbuh yang diberikan pada media kultur jaringan juga sesuai ukurannya karena semakin rendah atau semakin tinggi zat pengatur tumbuh yang diberikan maka berpengaruh pula proses fisiologis yang terjadi pada eksplan yang akan membentuk kalus tersebut.

Allah juga menegaskan dalam firman-Nya surat Al Qamar/54:49 yang berbunyi:

إِنَّا كُلَّ شَيْءٍ خَلَقْنَاهُ بِقَدَرٍ

Artinya : “Sesungguhnya Kami menciptakan segala sesuatu menurut ukuran”.(QS. Al Qamar/54:49)

Jenis eksplan juga mempengaruhi berat basah kalus. Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa eksplan daun menghasilkan berat kalus tertinggi (Gambar 4.5). Hal ini disebabkan karena pada eksplan daun menurut Taiz dan Zeiger (2002) dalam Darwati (2007), banyak mengandung pektat dan protein sedangkan tangkai daun (petiol) lebih banyak mengandung selulosa, karena banyak mengandung selulosa inilah yang menyebabkan pertumbuhan kalus kurang cepat disebabkan proses perombakan eksplan memerlukan waktu yang lama. Hal ini juga dikuatkan dengan penelitian yang dilakukan Fletcher, *et.al.*, (2011), eksplan daun pada kultur *Manihot esculenta* Crantz menghasilkan kalus tertinggi dibandingkan dengan eksplan batang petiol dan tunas.

Penambahan 2,4-D (1,3,5 ppm) secara independen tertinggi terhadap berat basah kalus yaitu pada eksplan daun 3 ppm dan ekplan petiol 1 ppm

tetapi tidak memberi pengaruh nyata terhadap pertumbuhan kalus Purwoceng pada media DKW (Darwati, 2007).

Berat kalus dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya yaitu hormon yang diberikan, warna dari kalus serta tekstur kalus. Berdasarkan hasil penelitian kalus dengan berat tertinggi memiliki tekstur kompak dengan warna hijau kekuningan. Wardani (2004), menyatakan bahwa perbedaan laju pertumbuhan juga dipengaruhi oleh kemampuan jaringan untuk menyerap zat-zat hara yang tersedia, hal ini banyak dipengaruhi oleh aerasi dan tekstur kalus. Kalus yang terlalu padat dan kompak mempunyai kemampuan menyerap zat hara lebih rendah daripada tekstur kalus yang tidak terlalu padat.

4.2 Pengaruh Jenis Eksplan dan Konsentrasi ZPT 2,4-D terhadap Kadar Stigmasterol dan Sitosterol Kalus Purwoceng

4.2.1 Uji Kadar Stigmasterol dan Sitosterol dengan Kromatografi Kolom

Metabolit sekunder merupakan hasil dari metabolisme tanaman yang bukan hasil metabolisme utama. Pada tanaman tingkat tinggi menghasilkan tingkat metabolit sekunder yang beragam. Kandungan metabolit sekunder juga dipengaruhi oleh keadaan lingkungan tempat tumbuhan tersebut hidup. Untuk dapat mengambil metabolit sekunder dari suatu tanaman (kalus) dapat dilakukan ekstraksi pada kalus tersebut. Ekstraksi sendiri merupakan kegiatan penarikan zat yang dapat larut dari bahan yang tidak dapat larut dengan pelarut cair.

Kalus Purwoceng dari beberapa perlakuan dipanen pada minggu ke delapan untuk diuji kadar stigmasterol dan sitosterol. Pengujian kadar metabolit sekunder dilakukan dengan menggunakan dengan kromatografi kolom. Mula-mula 0,1 g kalus dimaserasi dengan menggunakan methanol untuk membentuk fraksi methan, kemudian diekstrak kembali menggunakan n-hexane untuk memperoleh fraksi hexane. Dimasukkan hasil ekstraksi (fase eter) sebanyak 10 ml ke dalam kolom yang berisi silica gel, 61% H₂O, pH 6–7, ukuran partikel 25 µm (Sklárny Kavalier, CR), hexamethyl disilazan (HMDS) purum >98%, trimethyl chlorsilan (TMCS) puriss. >99%, pyridine purum >99 %. Untuk menganalisis antara stigmasterol dan sitosterol, maka hasil ditunggu sesuai dengan standar waktu yang telah ditentukan. Cairan yang telah ditampung diambil sebanyak 50 µl ditambahkan aquades sampai 1000 µl kemudian diabsorbansi menggunakan spektrofotometri. Hasil dianalisis sesuai dengan standard yang telah ditentukan.

4.2.2 Kadar Stigmasterol dan Sitosterol Kalus Purwoceng

Berdasarkan hasil penelitian dan *Analysis of Variance* (ANOVA) tentang pengaruh jenis eksplan dan konsentrasi 2,4-D terhadap stigmasterol, diperoleh data pada perlakuan jenis eksplan*konsentrasi yang menunjukkan bahwa signifikansi < 0,05. Hal ini menunjukkan bahwa ada pengaruh jenis eksplan dan konsentrasi 2,4-D pada media terhadap kadar stigmasterol kalus Purwoceng. Hasil ini dapat dilihat pada lampiran 14.

Untuk mengetahui perbedaan pengaruh pemberian berbagai macam konsentrasi 2,4-D terhadap kadar stigmasterol, maka perlu dilakukan uji

lanjut dengan menggunakan uji DMRT 5%. Berdasarkan hasil uji DMRT 5% dari rata-rata kadar stigmasterol, maka di dapatkan notasi DMRT seperti pada tabel 4.5.

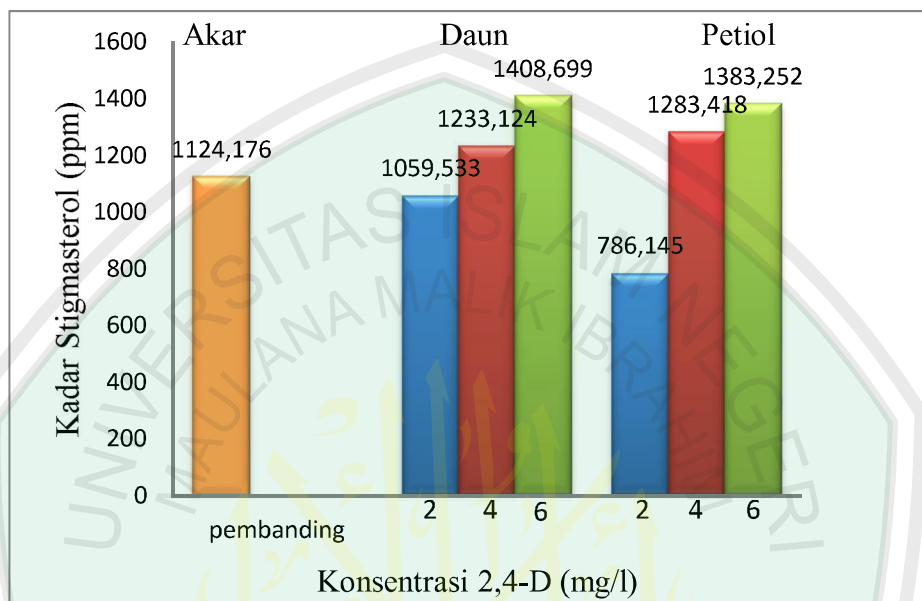
Tabel 4.5 Pengaruh Jenis Eksplan dan Konsentrasi ZPT 2,4-D terhadap Kadar Stigmasterol

No.	Eksplan	Konsentrasi 2,4-D (mg/l)	Kadar Stigmasterol (ppm)
1.	Daun	2	1059,533 b
		4	1233,124 c
		6	1408,699 d
2.	Petiol	2	786,145 a
		4	1283,418 c
		6	1383,252 d

Keterangan: Angka yang didampingi adalah huruf yang sama pada kolom yang bersesuaian menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji DMRT pada taraf $\alpha = 0.05$

Tabel 4.5 menunjukkan bahwa interaksi antar jenis eksplan dan konsentrasi 2,4-D menunjukkan kadar stigmasterol yang berbeda. Eksplan petiol dari konsentrasi 2,4-D 2 mg/l berbeda nyata dengan eksplan daun 2mg/l, eksplan daun dan petiol konsentrasi 4 mg/l dan 6 mg/l. Kadar stigmasterol tertinggi yaitu eksplan daun pada konsentrasi 2,4-D 6 mg/l dengan kadar rata-rata 1408,699 ppm, tetapi tidak berbeda nyata dengan konsentrasi 2,4-D 6 mg/l. Kadar stigmasterol rata-rata eksplan petiol konsentrasi 2,4-D 6 mg/l yaitu 1383,252 ppm. Konsentrasi 2,4-D 4 mg/l petiol menghasilkan kadar 1283,418 ppm sedangkan daun 2,4-D 4 mg/l menghasilkan kadar stigmasterol sebesar 1233,124 ppm. Konsentrasi 2,4-D 2 mg/l eksplan daun menghasilkan kadar stigmasterol sebesar 1059,533 ppm dan kadar terendah stigmasterol yaitu pada konsentrasi 2,4-D 2 mg/l pada

eksplan petiol yaitu 786,145 ppm. Sedangkan hasil herba lapang yaitu sebesar 1124,176 ppm. Hasil kadar stigmasterol dapat dilihat pada (Gambar 4.6 dan Lampiran 11).



Gambar 4.6 Hubungan antara jenis eksplan dan konsentrasi ZPT 2,4-D terhadap kadar stigmasterol kalus Purwoceng

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar stigmasterol dari kultur jaringan menunjukkan hasil yang lebih besar dari pada tanaman herba lapang, dalam hal ini ditunjukkan pada konsentrasi 2,4-D 4 dan 2,4-D 6 mg/l dari eksplan daun maupun petiol kadar stigmasterol lebih tinggi daripada tanaman lapang. Berdasarkan hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi 2,4-D yang diberikan pada media maka semakin tinggi pula kandungan stigmasterol yang dihasilkan. Sedangkan jika dilihat dari jenis eksplan yang digunakan diketahui bahwa eksplan daun lebih tinggi kandungan metabolit sekundernya dari pada eksplan petiol. Hal ini

disebabkan karena sebagaimana fungsinya daun melakukan metabolisme yang cukup tinggi dibandingkan dengan petiol.

Berdasarkan hasil penelitian dan *Analysis of Variance* (ANOVA) tentang pengaruh jenis eksplan dan konsentrasi 2,4-D terhadap sitosterol, diperoleh data pada perlakuan jenis eksplan*konsentrasi yang menunjukkan bahwa signifikansi $< 0,05$. Hal ini menunjukkan bahwa ada pengaruh jenis eksplan dan konsentrasi 2,4-D pada media terhadap kadar stigmasterol kalus Purwoceng. Hasil ini dapat dilihat pada lampiran 15.

Untuk mengetahui pengaruh pemberian berbagai macam konsentrasi 2,4-D terhadap kadar sitosterol, maka perlu dilakukan uji lanjut dengan menggunakan uji DMRT 5%. Berdasarkan hasil uji DMRT 5% dari rata-rata kadar stigmasterol, maka di dapatkan notasi DMRT seperti pada tabel 4.6.

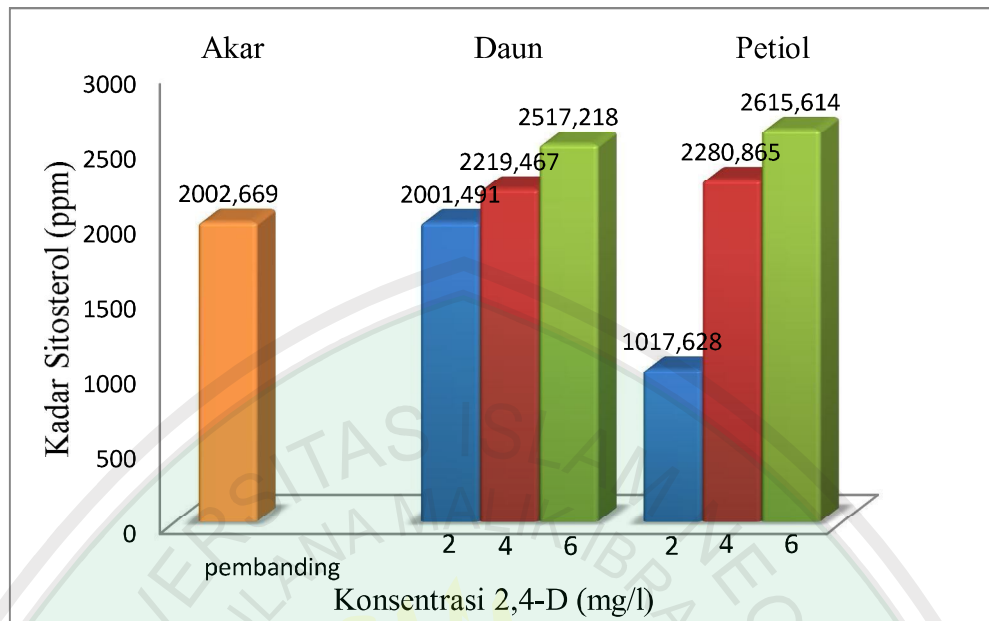
Tabel 4.6 Pengaruh Jenis Eksplan dan Konsentrasi ZPT 2,4-D terhadap Kadar Sitosterol

No.	Eksplan	Konsentrasi 2,4-D (mg/l)	Kadar Sitosterol (ppm)
1.	Daun	2	2001,982 b
		4	2219,467c
		6	2517,218 d
2.	Petiol	2	1017,628 a
		4	2280,865 c
		6	2615,614 d

Keterangan: Angka yang didampingi adalah huruf yang sama pada kolom yang bersesuaian menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji DMRT pada taraf $\alpha = 0.05$

Tabel 4.6 menunjukkan bahwa interaksi antar jenis eksplan dan konsentrasi 2,4-D menunjukkan menunjukkan kadar sitosterol yang berbeda. Eksplan petiol dari

konsentrasi 2,4-D 2 mg/l berbeda nyata dengan eksplan daun 2mg/l, eksplan daun dan petiol konsentrasi 4 mg/l dan 6 mg/l. Kadar sitosterol tertinggi yaitu eksplan petiol konsentrasi 2,4-D 6 mg/l dengan kadar rata-rata 2615,614 ppm, tetapi tidak berbeda nyata dengan konsentrasi 2,4-D 6 mg/l eksplan daun. Kadar sitosterol daun konsentrasi 2,4-D 6 mg/l dengan kadar rata-rata 2517,218 ppm. Konsentrasi 2,4-D 4 mg/l petiol menghasilkan kadar 2280,865 ppm sedangkan daun 2,4-D 4 mg/l menghasilkan kadar sitosterol sebesar 2219,467 ppm. Konsentrasi 2,4-D 2 mg/l eksplan daun menghasilkan kadar sitosterol sebesar 2001,491 ppm dan kadar terendah sitosterol yaitu pada konsentrasi 2,4-D 2 mg/l pada eksplan petiol yaitu 1017,628 ppm. Sedangkan hasil herba lapang yaitu sebesar 2002,669 ppm. Hasil tersebut menunjukkan bahwa hasil metabolit sekunder yang berasal dari kultur jaringan menunjukkan hasil yang lebih tinggi daripada herba lapang. Hal ini ditunjukkan pada konsentrasi 2,4-D 6 mg/l dari eksplan daun maupun petiol kadar sitosterol lebih tinggi daripada kadar sitosterol dari herba lapang (Gambar 4.7).



Gambar 4.7 Hubungan antara jenis eksplan dan konsentrasi ZPT 2,4-D terhadap kadar sitosterol kalus Purwoceng

Konsentrasi 2,4-D yang semakin tinggi yang diberikan memberikan hasil kadar sitosterol yang semakin tinggi pula, hal tersebut dapat terlihat dilihat pada diagram dimana kadar tertinggi pada konsentrasi 2,4-D 6 mg/l, tetapi jika dilihat dari jenis eksplan yang digunakan kadar sitosterol tertinggi pada eksplan petiol berbeda dengan stigmasterol yang kadar tertingginya berasal dari konsentrasi daun.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi 2,4-D yang diberikan dihasilkan kadar stigmasterol dan sitosterol yang tinggi pula. Hal ini disebabkan karena dengan semakin tinggi zat pengatur tumbuh yang diberikan maka semakin tinggi pula metabolisme yang terjadi pada eksplan tersebut, sehingga produksi metabolit sekunder meningkat.

2,4-D dapat digunakan untuk meningkatkan produksi metabolit sekunder. 2,4-D dapat menyebabkan cekaman abiotik bila konsentrasi yang diberikan cukup banyak sehingga dapat menyebabkan terjadinya cekaman pada tumbuhan yang ditanam, karena adanya cekaman ini menyebabkan produksi metabolit yang dihasilkan cukup meningkat. Selain zat pengatur tumbuh jenis eksplan juga mempengaruhi kadar metabolit sekunder. Jenis eksplan menghasilkan kadar metabolit sekunder yang berbeda karena daun merupakan organ tanaman yang fungsi sebagai tempat fotosintesis dan metabolisme yang lain, sehingga diperoleh hasil yang lebih tinggi. Darwati (2007), menyatakan bahwa hasil kadar metabolit sekunder dihasilkan eksplan daun lebih tinggi dari pada eksplant petiol.

Hal ini didukung oleh hasil penelitian Wardani (2004), 2,4-D efektif untuk meningkatkan produksi saponin kalus *T. paniculatum*. Penambahan 2,4-D pada konsentrasi yang rendah ternyata sudah dapat meningkatkan kadar saponin. Semakin tinggi konsentrasi 2,4-D yang ditambahkan dalam media, kadar saponin yang dihasilkan juga semakin meningkat.

Pemberian zat pengatur tumbuh dapat mempengaruhi produksi metabolit sekunder, hal ini disebabkan zat pengatur tumbuh yang ditambahkan dapat menyebabkan perubahan fisiologi dan biokimia tumbuhan melalui pengaturan kerja enzim. ZPT akan menginduksi sintesis enzim yang ekspresinya tergantung sintesis RNA dan protein. Peningkatan jumlah enzim yang terlibat dalam metabolit sekunder juga akan meningkatkan senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan (Wardani, 2004).

Zat pengatur tumbuh (ZPT) yang banyak digunakan dalam kultur jaringan adalah jenis auksin. Salah satu ZPT golongan auksin yang sering digunakan yaitu 2,4-D, dimana ZPT ini berperan dalam merangsang pembelahan dan pembesaran sel. Penambahan 2,4-D dalam jumlah besar menyebabkan terjadinya pertumbuhan kalus dari ekplan yang ditumbuhkan. Abidin (1983), auksin berupa 2,4-D dapat menaikkan tekanan osmotik, meningkatkan permeabilitas sel terhadap air, menyebabkan pengurangan tekanan pada dinding sel, meningkatkan sintesis protein, meningkatkan plastisitas dan pengembangan dinding sel.

Zat pengatur tumbuh (2,4-D) terikat pada membran protein penerima di membran plasma sel. Kompleks ikatan ini mengaktifkan enzim fosfolipase C (PLC). Enzim PLC ini menghidrolisis fosfatidil inositol 4,5-bisfosfat (PIP_2) menghasilkan inositol 1,4,5-trisfosfat (IP_3) dan diasil gliserol (DAG). IP_3 bergerak menuju vakuola sehingga menyebabkan terlepasnya Ca^{2+} simpanan masuk ke dalam sitosol. Meningkatnya konsentrasi Ca^{2+} di sitosol menyebabkan empat buah Ca^{2+} bergabung membentuk kompleks dengan kalmodulin tidak aktif menjadi kalmodulin aktif, hal ini mengaktifkan beberapa enzim yang berperan dalam sintesis saponin seperti enzim kinase, skualen sintetase dan enzim NAD^+ kinase. Sedangkan DAG yang tidak larut dalam air berfungsi dalam membran plasma. DAG mengaktifkan enzim pada membran yaitu protein kinase c (PKC). Enzim ini menggunakan ATP untuk memfosforilasi beberapa enzim tertentu yang mengatur pada tahap-tahap metabolisme (Salisbury dan Ross, 1995).