

BAB II

KAJIAN PUSTAKA

2.1.Sambiloto

Andrographis paniculata Nees (Acanthaceae) paling dikenal dengan “raja pahit”, tanaman ini termasuk dalam herba parenial yang tersebar di China, Asia Selatan, Afrika Selatan, India, Pakistan dan Sri Lanka (Anju, *et al.*, 2012). *Andrographis paniculata* (Burm. F.) Nees atau sambiloto dapat tumbuh di dataran rendah sampai ketinggian lebih kurang 700 m di atas permukaan air laut (dpl), tetapi lebih sering ditemukan di tempat dengan ketinggian di bawah 10 m dpl (Habibah, 2009). Penyebaran sambiloto di Indonesia dapat dilihat dari banyaknya sebutan sambiloto untuk masing-masing daerah. Di Jawa Tengah dan Jawa Timur menyebutnya bidara, sambiroto, sandiloto, sadilata, sambilata, takilo, paitan, dan sambilotot. Di Jawa Barat disebut dengan ki oray, takila, atau ki perut. Di Bali dikenal dengan nama samiroto, masyarakat Sumatra dan Melayu menyebutnya dengan pepaitan atau empedu. Sedangkan ntuk nama-nama asing sambiloto adalah chuan xin lian, yi jian xi, dan lan he lian (China), kalmegh, kirayat, dan kirata (India), nilavembu (Tamil), xuyen tam lien dan cong-cong (Vietnam), quasabhuvu (Arab), nainehavandi (Persia), green chretta, chiretta, the creat, creat root, halviva, kariyat, kreat, dan king of bitter (Prapanza dan Lukito, 2003).

2.1.1. Klasifikasi

Menurut Anju (2012) tanaman sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom Plantae

Divisi Angiosperma

Kelas Dikotil

Ordo Tubiflorae

Suku Acanthaceae

Genus *Andrographis*

Spesies *Andrographispaniculata* Nees

2.1.2. Morfologi

Tanaman sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) (Gambar 2.1.2) adalah tanaman yang memiliki batang berbentuk segi enam dengan nodus yang membesar serta mempunyai banyak cabang. Tanaman ini tumbuh tegak dengan tinggi 0,3-1,0 dengan permukaan atas daun berwarna hijau kelam dan permukaan bawahnya berwarna merah muda. Bentuk daunnya ramping agak memanjang dengan bagian pangkal dan ujungnya runcing, tepi daunnya rata, penampang melintang dengan letak saling berhadapan, serta daun bagian atas cabang berbentuk seperti daun pelindung. Panjang daunnya berkisar antara 2-8 cm dan lebar 1-3 cm serta tangkai daun yang sangat pendek dan bahkan hampir tidak bertangkai. Percabangan batang banyak dan

dari ujung batang atau ketiak daunnya akan keluar bunga yang berukuran kecil dengan warna putih keunguan yang tersusun dalam rangkaian bentuk tandan yang melengkung kearah bawah (Nababan, 2008).

Bunga tumbuh tegak dan bercabang berbentuk tabung dan berbibir, dengan bibir bunga atas berwarna putih, dengan warna kuning dibagian kepala, serta bibir bunga bawah berbentuk baji berwarna ungu. Buah berbentuk memanjang sampai lonjong, panjangnya berkisar 1,5 cm dan lebar 0,5 cm, terdiri dari dua rongga berwarna hijau, di dalam setiap rongga terdapat 3-7 biji kecil. Pangkal dan ujung buah tajam, setelah masak buah akan pecah menjadi empat keping. Biji kecil, gepeng, dan berwarna coklat muda (gambar 2.1.2) (Prapanza dan Lukito, 2003).



Gambar 2.1.2 (A) Tanaman (B) Biji *Andrographis paniculata* Nees

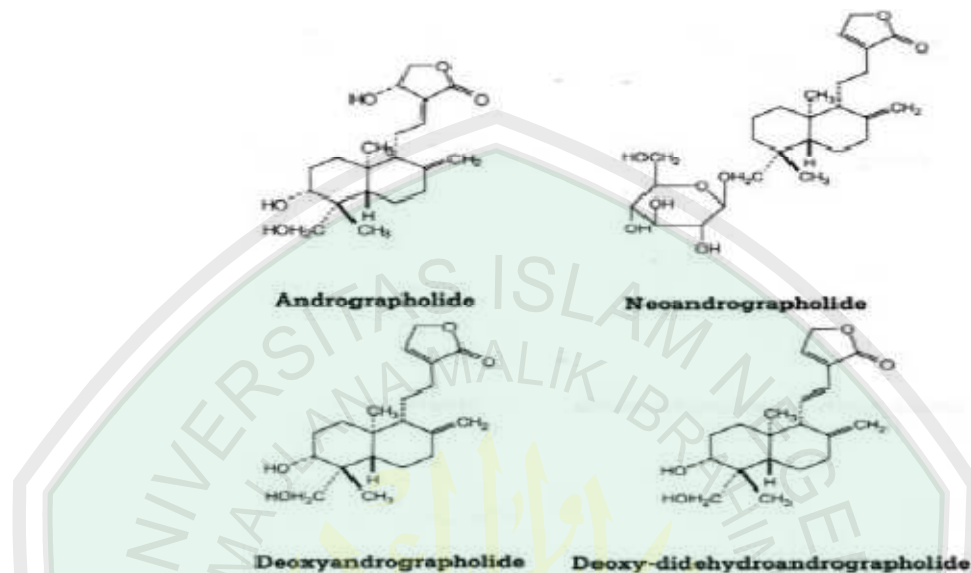
(MPRI, 1998 dalam Naiyana, 2002)

2.1.3. Kandungan Kimia

Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) pertama kali diteliti oleh Borsma pada tahun 1896 dengan menemukan adanya kandungan Andrographolid yang rasanya pahit. Kemudian pada tahun 1911 Cortner mengisolasi adanya senyawa lakton (SCHRI 1973 dalam Naiyana 2002). Menurut Dandin dan Hosakatte (2012) lakton yang terkandung dalam sambiloto terdiri dari empat jenis yaitu: Deoxyandrographolid (Andrographis a), Andrographolid (Andrographis b), Neoandrographolid (Andrographis c), dan Deoxydehidroandrographolid (Andrographis d). Andrographolid dan lakton (Gambar 2.1.3) yang terdapat pada sambiloto merupakan bahan aktif yang berfungsi sebagai obat. Kadar andrografolid pada tanaman konvensional berkisar antara 2-3% dari berat kering (Sharimila, 2013).

Bahan kimia lain yang juga terdapat dalam sambiloto adalah diterpenoid yang terdiri dari deoxyandrographolid, -19-D-glukosa yang sebagian besar diisolasi dari daun (Martin, 2004). Menurut Sharmila, *et al* (2013), kandungan terpenting dari senyawa diterpenoid yang terdapat pada sambiloto adalah: 14-dioxyandrographis (DA, $C_{20}H_{30}O_4$), dan 14-deoxy-11,12-didehydrographolid (DDA, $C_{20}H_{28}O_4$). Flavonoid diisolasi terbanyak dari akar yaitu polymethoxyflavon, andrographin, panicolin, mono-o-methylwightin,

apigenin, 7,4-dimetil eter, alkalene, keton, aldehyd, K, Ca, Na, asam kersil, dan damar.



Gambar 2.1.3 Struktur kimia bahan aktif yang terdapat pada daun Sambiloto

(MPRI, 1999 *dalam* Naiyana, 2002)

Konsentrasi bahan aktif yang terkandung pada sambiloto dapat dipengaruhi oleh lokasi (tempat) tumbuh dan musim dimana tumbuh baik pada daerah tropis dan subtropis seperti Cina dan Asia Tenggara (Nababan, 2008). Menurut MPRI (1999) *dalam* Naiyana (2002) konsentrasi bahan aktifnya paling banyak ditemukan pada daun dan paling sedikit pada batang, sedangkan menurut Anju (2012) konsentrasi bahan aktif paling sedikit ditemukan pada biji. Secara keseluruhan konsentrasi bahan aktif paling banyak terdapat pada tumbuhan muda daripada tumbuhan tua.

Zat aktif yang memiliki rasa pahit dan memiliki fungsi sebagai obat adalah andrografolid dan neo-andrografolid. Bahan aktif ini banyak mengandung unsur-unsur mineral, seperti panikulin, asam kersik, damar serta mineral berupa kalium, kalsium, dan natrium (Habibah, 2009).

2.1.4. Khasiat Penggunaan

Andrographis paniculata Ness., yang dikenal dengan “Raja Pahit” termasuk dalam *family* Acanthaceae. Daun tanaman ini telah digunakan sebagai obat tradisional untuk mengobati hepatitis, bronkitis, batuk, demam, tuberkulosis, disentri, racun ular dan diare (Dandin dan Hossakate, 2012). Senyawa kimia aktif yang terkandung adalah berasal dari golongan diterpen lakton, flavonoid dan polifenol. Senyawa kimia aktif tersebut adalah andrograpanin, andropanosi, andrographolit, dan neoandrograpolit (Martin, 2004). Senyawa kimia aktif yang paling dominan adalah andrograpolit yang termasuk dalam golongan diterpen lakton (Dandin dan Hosakatte, 2012). Senyawa-senyawa kimia aktif yang terkandung dalam tanaman sambiloto juga memiliki khasiat untuk antikanker, meningkatkan imunitas, antivirus, antijamur, antioxidant dan anti-HIV (Gandi, *et al.*, 2012).

Bahan aktif andrografolid dan neoandrografolid yang rasanya sangat pahit banyak mengandung unsur-unsur mineral seperti kalium sehingga dapat membantu tubuh dalam mengeluarkan air dan garam yang dapat menurunkan tekanan darah. Zat andrografolid juga dapat

meningkatkan sistem kekebalan dengan menghasilkan sel-sel darah putih untuk menghancurkan bakteri dan benda asing lainnya, serta mengaktifkan sistem limpa (Wibudi, 2006). Sedangkan neoandrografolid, dehydro andrografolid, mampu menurunkan demam yang disebabkan oleh berbagai bakteri misalnya *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, dan *Shigella dysenteriae* (Prapanza dan Lukito, 2003).

Penelitian mengenai sintesis andrografolid saat ini banyak dilakukan karena potensinya sebagai obat antikanker. Andrografolid secara signifikan menghambat proliferasi sel kanker kolon HT-29. Andrografolid juga memperlihatkan aktivitas antikanker pada berbagai sel kanker yang mewakili berbagai tipe manusia (Ajun, *et al.*, 2012). Andrografolid melakukan aktivitas antikanker secara langsung pada sel kanker dengan menahan siklus sel pada fase G₀/G₁ melalui induksi protein inhibitor siklus sel p27 dan menurunkan ekspresi cyclindependent kinase 4 (CDK4). Aktivitas immunostimulatori dari andrografolid dilakukan dengan peningkatan proliferasi limfosit dan produksi interleukin-2. Andrografolid juga meningkatkan produksi faktor-alpha nekrosis tumor dan ekspresi *CD marker*, menghasilkan peningkatan aktivitas antikanker tidak langsung (Nababan, 2008).

Saponin yang terdapat pada tumbuhan *Andrographis paniculata* terdiri dari sejumlah glikosida yang juga terdapat pada banyak tanaman lain. Glikosida ini terdapat pada lebih dari 500 spesies

dari spermatopita (Ajun, *et al.*, 2012). Saponin memiliki sifat seperti sabun yang menghasilkan buih apabila dicampur dengan air. Sifat lain dari saponin antara lain rasanya pahit, sebagai detergen yang baik, beracun bagi hewan berdarah dingin, tidak beracun pada hewan berdarah panas, serta mempunyai sifat anti eksudatif dan antiinflamasi (Sarker, 2009). Saponin bersama dengan fosfolipid dan protein mampu membentuk kompleks imunostimulating, serta dapat berfungsi sebagai adjuvan. Saponin juga dapat mengurangi rasa sakit, maupun membunuh kuman, dan merangsang pertumbuhan sel-sel baru pada kulit (Gunawan, 2004).

Tanin yang terkandung dalam sambiloto memiliki sifat astringen yang dapat mengurangi kontraksi usus sehingga diare dapat dihentikan dan mengobati gangguan pencernaan (Syamsuhidayat dan Hutapea, 1991 *dalam* Nababan, 2008).

2.2. Kultur Jaringan

Kultur jaringan adalah teknik memperbanyak tanaman dengan cara memperbanyak jaringan mikro tanaman yang ditumbuhkan secara *in vitro* menjadi tanaman yang sempurna dalam jumlah yang tidak terbatas. Yang menjadi dasar kultur jaringan ini adalah *totipotensi* sel, yaitu bahwa setiap sel organ tanaman mampu tumbuh menjadi tanaman yang sempurna bila ditempatkan di lingkungan yang sesuai (Yuliarti, 2010). Menurut Azriati, dkk (2010), kultur *in vitro* adalah suatu metode untuk mengisolasi potongan

jaringan tanaman dari kondisi alami pada media nutrisi dalam kondisi aseptik, dimana potongan jaringan yang diambil mampu mengadakan perbesaran, perpanjangan, dan pembelahan sel dan membentuk suatu massa sel yang belum terdeferensiasi yang disebut kalus serta membentuk *shootlet* (tunas), *rootlet* (akar), atau *planlet* (tanaman lengkap).

Usaha pengembangan tanaman dengan kultur jaringan merupakan usaha perbanyakan vegetative tanaman yang dapat dikatakan masih baru. Namun, saat ini sudah banyak sekali penemuan-penemuan tentang ilmu pengetahuan kultur jaringan dalam bidang pertanian, biologi, farmasi, kedokteran dan sebagainya. Di bidang farmasi, teknik kultur jaringan sangat menguntungkan karena dapat menghasilkan metabolit sekunder untuk keperluan obat-obatan dalam jumlah yang besar dan dalam waktu yang singkat (Daisy, 2012).

Keuntungan perbanyakan secara kultur jaringan adalah: (1) waktu perbanyakan lebih cepat; (2) jumlah benih yang dihalikan tidak terbatas; (3) jumlah eksplan yang digunakan kecil; (4) bebas hama dan penyakit; (5) memerlukan lahan sempit; dan (6) genotipe sama dengan induknya (George dan Sherington, 1984 *dalam* Surachman, 2011). Beberapa keuntungan dari pemakaian teknik kultur *in-vitro* untuk produksi metabolit sekunder antara lain: tidak tergantung musim, sistem produksi dapat diatur sesuai kebutuhan, lebih konsisten, dan mengurangi penggunaan lahan (Wattimena, 1992 *dalam* Sutini dkk, 2008). Beberapa keuntungan lain untuk menghasilkan metabolit sekunder melalui teknik kultur jaringan juga disebutkan oleh Fowler (1983)

dalam Ratnasari dkk, (2001) yakni, keuntungan tersebut diantaranya adalah penggunaan lahan sedikit, kualitas produk yang dihasilkan lebih konsisten dan dapat dihasilkan terus menerus, serta metabolit sekunder yang dihasilkan mudah untuk dimurnikan.

2.3.Keseimbangan Hormon Eksogen dan Endogen

Hormon di dalam tanaman merupakan produk metabolit (Kaufan, 1999 dalam Ibrahim, 2010). Secara *in vivo*, kalus pada umumnya terbentuk pada bekas-bekas luka akibat serangan infeksi mikroorganisme, gigitan, atau tusuka serangga dan nematode. Pembentukan kalus pada jaringan luka dipacu oleh zat pengatur tumbuh auksin dan sitokinin endogen (Gunawan, 1988 dalam Dwi, 2012). Adanya luka irisan 2,4-D lebih mudah berdifusi ke dalam jaringan tanaman, sehingga 2,4-D yang diberikan akan membantu auksin endogen untuk menstimulasi atau merangsang pembelahan sel, terutama sel-sel di sekitar area luka (Ulfa, 2011 dalam Ariati, 2012). Menurut Surachman (2011), komponen-komponen yang terkandung di dalam air kelapa dapat berinteraksi dengan hormon endogen yang dimiliki oleh setiap eksplan sehingga mampu merangsang pembelahan sel.

Menurut Abidin (1985), jika rasio auksin lebih rendah daripada sitokinin maka organogenesis akan mengarah ke tunas, jika rasio auksin seimbang dengan sitokinin maka akan mengarah ke pembentukan kalus sedangkan jika rasio auksin lebih tinggi daripada sitokinin maka organogenesis akan cenderung mengarah ke pembentukan akar.

2.4.2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)

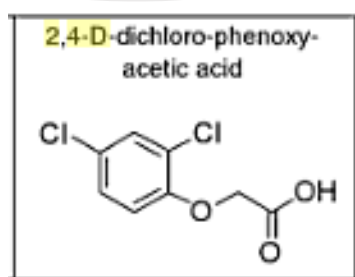
Zat pengatur tumbuh (ZPT) yang sering digunakan untuk menginduksi pembentukan kalus adalah auksin (Indah dan Dini, 2013). Auksin menginisiasi pemanjangan sel dengan cara mempengaruhi fleksibilitas dinding sel dan memacu protein tertentu yang ada di membran plasma untuk memompa ion H^+ ke dinding sel. Ion H^+ mengaktifkan enzim tertentu sehingga memutuskan ikatan silang hidrogen rantai molekul selulosa penyusun dinding sel. Sel tumbuh memanjang akibat air yang masuk secara osmosis. Sel terus tumbuh dengan mensintesa kembali mineral dinding sel dan sitoplasma (Widiarti, 2009).

Diantara golongan auksin yang umum digunakan pada media kultur jaringan adalah 2,4-D dan IAA (Indah dan Dini, 2013). IAA dapat mengalami degradasi yang disebabkan oleh adanya cahaya ataupun dapat diuraikan oleh enzim oksidatif. Oleh karena sifatnya yang labil ini, maka IAA jarang digunakan sebagai eksplan. Beberapa kultur mungkin tidak memerlukan zat pengatur tumbuh auksin lagi, karena auksin yang endogen (dibuat dalam tubuh tanaman) sudah cukup untuk memenuhi kebutuhan kultur yang bersangkutan (Daisy, 2012).

NAA dan 2,4-D merupakan golongan auksin sintesis yang mempunyai sifat stabil daripada IAA, karena tidak mudah terurai oleh enzim-enzim yang dikeluarkan oleh sel atau oleh pemanasan pada proses sterilisasi (Daisy, 2012). 2,4-D merupakan auksin kuat yang sering digunakan

secara tunggal untuk menginduksi terbentuknya kalus dari berbagai jaringan tanaman (Hojwani, 1996 *dalam* Syahid dan Natalini, 2007).

Auksin adalah senyawa yang berpengaruh terhadap perkembangan sel, menaikkan tekanan osmotik, meningkatkan sintesis protein, meningkatkan permeabilitas sel terhadap air dan melenturkan atau melunakkan dinding sel yang diikuti menurunnya tekanan dinding sel sehingga air dapat masuk ke dalam sel yang disertai dengan kenaikan volume sel (Kartikasari, 2013). 2,4-D merupakan auksin yang paling banyak digunakan untuk induksi embriogenesis somatik. 2,4-D merupakan zat pengatur tumbuh yang paling efektif dalam produksi kultur embriogenik (Bhojwani, 1996). Pemberian 2,4-D pada konsentrasi 10^{-7} - 10^{-5} M tanpa sitokinin sangat efektif untuk induksi proliferasi kalus pada kebanyakan kultur. Senyawa tersebut dapat menekan organogenesis dan sebaiknya tidak digunakan pada kultur yang melibatkan inisiasi pucuk dan akar. Pierik (1997) menganjurkan untuk membatasi penggunaan 2,4-D pada kultur *in vitro* karena 2,4-D dapat meningkatkan peluang terjadinya mutasi genetik dan menghambat fotosintesis pada tanaman yang diregenerasikan (Zulkarnain, 2011).



Gambar 2.5 Struktur kimia zat pengatur tumbuh 2,4-D (Schirmer, 2012)

2.5. Air Kelapa dalam Media Kultur Jaringan

Salah satu bahan organik yang dapat ditambahkan ke dalam media kultur adalah air kelapa. Keuntungan menggunakan bahan organik tersebut untuk media adalah karena harganya murah dan mengandung zat-zat kimia yang dibutuhkan oleh tanaman untuk tumbuh (Sari, dkk., 2011). Air kelapa sering kali digunakan dalam kultur jaringan sebagai pengganti BAP (Ariati, dkk., 2012). Aplikasi sitokinin dalam perbanyakan tanaman *in vitro* dapat berasal dari bahan kimia sintetik maupun bahan alami seperti air kelapa (Seswita, 2010 *dalam* Ariati, dkk., 2012).

Air kelapa merupakan endosperm atau cadangan makanan cair sumber energi, selain mengandung zat pengatur tumbuh. Air kelapa yang baik untuk kultur jaringan adalah air kelapa muda yang daging buahnya berwarna putih, belum keras tetapi masih dapat diambil dengan sendok (Surachman, 2011). Air kelapa mengandung zat atau bahan-bahan seperti karbohidrat, vitamin, mineral, protein, serta zat tumbuh auksin, sitokinin dan giberelin yang berfungsi sebagai penstimulir proliferasi jaringan, memperlancar metabolisme dan respirasi (Widiastoety, 1997 *dalam* Sari, 2011).

Air kelapa mengandung ZPT alami yang termasuk dalam golongan sitokinin (Priyono dan Danimahardja, 1991 *dalam* Kristina dan Sitti, 2012). Air kelapa merupakan senyawa organik yang sering digunakan dalam aplikasi teknik kultur jaringan. Hal ini disebabkan air kelapa mengandung 1,3 diphenilurea, zeatin, zeatin glukosida, dan zeatin ribosida (Armini, *et al.*, 1992 *dalam* Kristina dan Sitti, 2012), dan harganya yang murah. Air kelapa

merupakan air alami steril mengandung kadar K dan Cl tinggi. Selain itu, air kelapa mengandung sukrosa, fruktosa, dan glukosa (Netty, 2002 dalam Kristina dan Sitti, 2012).

Tingginya kandungan sitokinin maupun auksin terjadi karena ZPT tersebut diproduksi dalam jaringan meristematik yang aktif membelah. Air kelapa merupakan ZPT alami yang banyak digunakan dalam perbanyakan *in vitro* berbagai tanaman hias diantaranya anggrek, karena memiliki sitokinin (Kristina, 2012). Air kelapa merupakan bahan alami yang mempunyai aktivitas sitokinin untuk pembelahan sel dan mendorong pembentukan organ (Seswita, 2010).

Penggunaan kombinasi antara auksin dan sitokinin akan meningkatkan proses induksi kalus. Efektifitas zat pengatur tumbuh auksin maupun sitokinin eksogen bergantung pada konsentrasi hormon endogen dalam jaringan tanaman (Syahid dan Natalini, 2007). Pemberian sitokinin dalam kultur kalus berperan penting dalam memicu pembelahan dan pemanjangan sel sehingga dapat mempercepat perkembangan dan pertumbuhan kalus (Indah dan Dini, 2013). Senyawa 2,4-D merupakan salah satu jenis auksin yang sangat efektif untuk menginduksi pembentukan kalus, walaupun auksin yang berperan utama tetapi sitokinin sangat dibutuhkan untuk proliferasi kalus sehingga kombinasi auksin dan sitokinin sangat baik untuk memacu pertumbuhan kalus (Abidin, 1982).

Perlakuan sterilisasi dengan autoklaf menurunkan kandungan ZPT alami dalam air kelapa. ZPT alami memiliki sifat mudah terdegradasi

sehingga akan terurai bila melalui proses pemanasan tinggi dengan autoklaf. Selain penurunan kandungan ZPT alami, warna air kelapa pun berubah menjadi kecokelatan. Namun, walaupun terjadi penurunan kandungan sebesar 10 kali lipat, ZPT tersebut masih dapat mendukung pertumbuhan kultur sehingga perlakuan sterilisasi dengan autoklaf tetap dapat digunakan (Kristina, 2012). Hal ini dapat dilihat pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1 Komposisi ZPT air kelapa muda pada dua perlakuan pemanasan (Kristina, 2012).

Perlakuan Pemanasan Air Kelapa	Konsentrasi ZPT Alami (mg/L)		
	Sitokinin		Auksin
	Kinetin	Zeatin	IAA
Tanpa Perlakuan	41,13	34,16	38,57
Pemanasan 50 ⁰ C, 10 menit	273,62	290,47	198,55
Pemanasan 121 ⁰ C, autoklaf	50,09	28,65	20,89

Kandungan vitamin dalam air kelapa muda cukup beragam, diantaranya thiamin dan piridoksin. Selain kandungan ZPT, kandungan vitamin dalam air kelapa dapat dijadikan substitusi vitamin sintetik yang terkandung padamedia MS. Kandungan hara makro seperti N, P, dan K, serta beberapa jenis unsur mikro dalam air kelapa muda juga berpeluang dikembangkan lebih lanjut sebagai upaya substitusi unsur hara makro dan mikro serta sumber karbon, yakni sukrosa. Konsentrasi garam mineral dan sukrosa air kelapa menurun seiring dengan bertambahnya umur dari 6-9 bulan. Di dalam air kelapa ditemukan 3 jenis gula, yakni glukosa dengan komposisi 34-45%, sukrosa dari 53% sampai 18% dan fruktosa dari 12- 36%. Sukrosa mengalami penurunan konsentrasi seiring dengan pertambahan umur

(Kristina, 2012). Komposisi vitamin, mineral dan sukrosa dalam air kelapa muda dan tua dapat dilihat pada tabel 2.2.

Tabel 2.1 Komposisi vitamin, mineral dan sukrosa dalam air kelapa muda dan tua (Kristina, 2012).

Komposisi	Air Kelapa Muda (mg/100mL)	Air Kelapa Tua (mg/100mL)
Vitamin		
Vitamin C	8,59	4,50
Riboflavin	0,26	0,25
Vitamin B5	0,60	0,62
Inositol	20,52	21,50
Piridoksin	0,03	-
Thiamin	0,02	-
Mineral		
N	43,00	-
P	13,17	12,50
K	14,11	15,37
Mg	9,11	7,52
Fe	0,25	0,32
Na	21,07	20,55
Mn	Tidak terdeteksi	Tidak terdeteksi
Zn	1,05	3,18
Ca	24,67	26,50
Sukrosa	4,89	3,45

Beberapa penelitian mengenai air kelapa untuk menginduksi kalus telah dilakukan. Penelitian Ariati, dkk., (2012) menunjukkan bahwa ada perbedaan hasil dalam pembentukan kalus dari setiap medium perlakuan juga dipengaruhi adanya air kelapa dalam medium. Medium yang ditumbuhkan dengan air kelapa (medium MS + 2 ppm 2,4-D + 15%, medium MS + 2 ppm 2,4-D + 0,2 ppm BAP + 15% Air Kelapa) akan menghasilkan kalus kakao yang sangat cepat sedangkan medium tanpa air kelapa (medium MS + 2 ppm 2,4-D dan medium MS + 2 ppm 2,4-D + 0,2 ppm BAP) akan menghasilkan

kalus yang sangat lama. Penelitian Naing (2011), menunjukkan pembentukan prosentase kalus terbaik dihasilkan pada media MS yang diberi 2 mg/l BA yang ditambah 5% air kelapa, prosentase kalus *Coelogyne cristata* yang terbentuk adalah 40%. Mohammad dan Mueen (2010) dalam penelitiannya menunjukkan bahwa kombinasi 2,4-D 2 mg/l ditambah 10% air kelapa menghasilkan kalus *Cyamopsis tetragonolubust* terbaik sebesar 70%.

Hasil pengamatan kultur kalus pada eksplan tanaman anggur hijau (*V. Vinifera* L.) menunjukkan bahwa eksplan daun mampu menghasilkan kalus pada minggu ke-2 HST terhadap semua perlakuan yang diberikan yaitu pada media MS dengan pemberian hormon 2,4-D dan air kelapa dengan konsentrasi 10% dan kombinasi medium MS + 2,4-D 1,5 ppm + air kelapa 10% menunjukkan perlakuan yang paling baik dengan sel yang aktif membelah (Dwi, dkk., 2012).

2.6. Kultur Kalus dan Kualitas Kalus

Selain kultur organ dalam kultur jaringan juga dikenal dengan kultur kalus atau *callus culture* merupakan kultur sekumpulan sel yang tidak terorganisir, hanya sel-sel parenkim yang berasal dari berbagai bahan awal (Dwi, dkk., 2012). Kultur kalus merupakan kultur sekumpulan sel yang tidak terorganisir yang berasal dari berbagai jaringan tumbuhan. Kultur kalus digunakan untuk memperoleh kalus dari eksplan yang diisolasi dan ditumbuhkan dalam lingkungan terkendali. Pembentukan kalus adalah

menginduksi bagian tanaman tertentu dengan memberikan zat pengatur tumbuh (Indah dan Dini, 2013).

Salah satu manfaat kultur kalus adalah untuk mendapatkan produk yang berupa kalus dari suatu eksplan yang dapat ditumbuhkan secara terus-menerus sehingga dapat dimanfaatkan dalam mempelajari metabolisme dan diferensiasi sel, morfogenesis sel, variasi somaklonal, transformasi genetik serta produksi metabolit sekunder juga merupakan beberapa manfaat dari hasil kultur kalus (Ariati, dkk., 2012).

Indikator pertumbuhan eksplan pada kultur *in vitro* berupa warna dan tekstur kalus menggambarkan penampilan *visual* kalus sehingga dapat diketahui kalus yang memiliki sel-sel yang aktif membelah atau sel telah mati (Indah dan Dini, 2013). Kalus adalah proliferasi masa jaringan yang belum terdiferensiasi. Masa sel ini terbentuk di seluruh permukaan irisan eksplan sehingga semakin luas permukaan irisan eksplan semakin cepat dan semakin banyak kalus yang terbentuk (Hendaryono dan Wijayanti, 1994).

2.6.1. Kalus Menghasilkan Metabolit Sekunder

Berdasarkan perubahan ukuran sel, metabolisme dan penampakan kalus, proses perubahannya dari eksplan menjadi kaus dapat dibagi menjadi tiga tahap yaitu induksi, pembelahan, dan diferensiasi. Tahap induksi, sel siap membelah, metabolisme menjadi aktif dan ukuran sel tetap konstan (Alitalia, 2008). Metabolisme sekunder pada umumnya meningkat pada fase stasioner. Hal ini dimungkinkan karena adanya peningkatan vakuola sel atau akumulasi (Darwati, 2007). Menurut Smith

(2000) dalam Alitalia (2008), fase stasioner adalah periode tidak ada pertumbuhan, jumlah sel konstan.

Menurut Abidin (1985), ZPT dapat mempengaruhi metabolisme asam nukleat yang berperan dalam sintesis protein dan mengatur aktivitas enzim untuk pertumbuhan tanaman yakni pertumbuhan awal berupa kalus. Aktifitas sel selama pertumbuhan seperti pembelahan sel, penambahan volume, dan akhirnya terjadi proliferasi sel dapat ditingkatkan dengan pemberian zat pengatur tumbuh (Wardani, 2004). Peningkatan pembelahan sel oleh pengaruh zat pengatur tumbuh dapat memacu laju pertumbuhan dan peningkatan biomasa kalus yang akhirnya dapat meningkatkan berat kalus (Azriati, 2010). 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 (Wattimena, 1991 dalam Wardani, 2004).

Hasil penelitian Oktafiani (2010) menunjukkan bahwa, kalus Pegagan yang diberi ion Cu^{2+} 15 μM sampai 30 μM mampu menghasilkan kandungan campuran triterpenoid kalus pegagan dengan nilai campuran triterpenoid ++. Menurut hasil penelitian Februyani (2013), menunjukkan hasil pada penambahan Cu^{2+} konsentrasi 40 μM menghasilkan metabolit sekunder tertinggi yaitu dengan kadar stigmasterol 1695.620 ppm dan sitosterol 3128.739 ppm pada kultur kalus tanaman Purwoceng.

2.6.2. Warna Kalus

Warna dan tekstur kalus merupakan indikasi awal dimulainya respon organogenesis. Kalus yang berwarna putih merupakan jaringan embrionik yang belum mengandung kloroplas, tetapi memiliki kandungan butir pati yang tinggi (Ariati, dkk., 2012). Warna kalus mengidentifikasi keberadaan klorofil dalam jaringan, semakin hijau warna kalus semakin banyak pula kandungan klorofilnya dalam kalus (Dwi, 2012).

Kondisi warna kalus yang bervariasi menurut Hedaryono dan Wijayani (1994) disebabkan oleh adanya pigmentasi, cahaya, dan bagian tanaman yang dijadikan sebagai sumber eksplan. Eksplan yang cenderung berwarna kecoklatan disebabkan oleh kondisi eksplan yang secara internal mempunyai kandungan fenol tinggi. Menurut Wardani, dkk., (2004), warna kalus yang hijau disebabkan peningkatan konsentrasi sitokinin yang tinggi. Sitokinin yang ditambahkan dalam media mampu menghambat perombakan butir-butir klorofil karena sitokinin mampu mengaktifkan proses metabolisme dan sintesis protein (Wattimena, 1991 dalam Wardani, dkk., 2004).

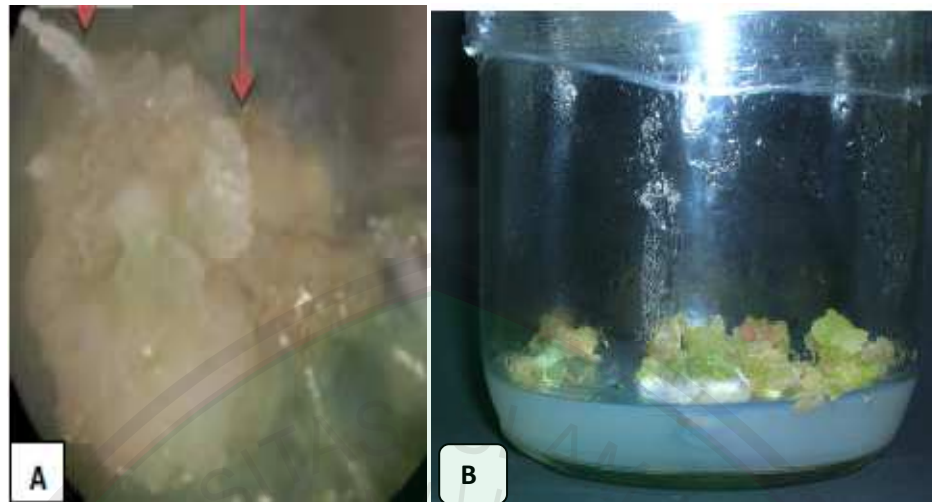
2.6.3. Tekstur Kalus

Tekstur kalus dapat dibedakan menjadi tiga macam, yaitu kompak (non friable), intermediet, dan remah (friable) (Gambar 2.5.2) (Dwi, dkk., 2012). Tekstur kalus merupakan salah satu penanda yang dipergunakan untuk menilai pertumbuhan suatu kalus. Kalus yang baik untuk digunakan

sebagai bahan penghasil metabolit sekunder yaitu memiliki tekstur kompak (*non friable*). Tekstur kalus yang kompak dianggap baik karena dapat mengakumulasi metabolit sekunder lebih banyak (Indah dan Dini, 2013).

Kalus yang kompak mempunyai tekstur yang sulit untuk dipisahkan dan terlihat padat (Fitriani, 2008 dalam Dwi, 2012). Menurut Dodd (1993) dalam Ariati, dkk (2012), kalus yang memiliki tekstur yang kompak umumnya memiliki ukuran sel kecil dengan sitoplasma padat, inti besar dan memiliki banyak pati gandum (karbohidrat). Menurut Adri (2012), menyatakan bahwa kalus kompak yang memiliki struktur seperti nodul merupakan massa proembrionik dan dapat digunakan sebagai inokulum untuk diinduksi sebagai embrio somatik. Kalus yang kompak merupakan efek dari sitokinin dan auksin yang mempengaruhi potensial air dalam sel. Hal ini menyebabkan penyerapan air dari medium ke dalam sel meningkat sehingga sel menjadi lebih kaku (Ariati, dkk., 2012).. Sehingga penggunaan air kelapa sangat bermanfaat dalam pembentukan tekstur kalus (Dwi,dkk., 2012).

Kalus remah merupakan kalus yang baik untuk perbanyakan jaringan. Kalus remah ialah kalus yang tumbuh terpisah-pisah menjadi bagian-bagian yang kecil, mudah lepas, dan mengandung banyak air (Sitorus, dkk., 2011). Kalus yang remah dapat diperoleh dengan cara melakukan sub kultur berulang-ulang dengan media padat (Rahayu, dkk., 2013).



Gambar 2.5.2. (A) Tekstur kompak kalus Gambir (Adri, 2012) dan (B) Tekstur remah kalus keladi tikus (Syahid dan Natalini, 2007).

2.7. Penelitian Mengenai Sambiloto dan Air Kelapa

Beberapa penelitian mengenai air kelapa untuk menginduksi kalus telah dilakukan. Penelitian Ariati, dkk., (2012) menunjukkan bahwa ada perbedaan hasil dalam pembentukan kalus dari setiap medium perlakuan juga dipengaruhi adanya air kelapa dalam medium. Medium yang ditumbuhkan dengan air kelapa (medium MS + 2 ppm 2,4-D + 15% air kelapa, medium MS + 2 ppm 2,4-D + 0,2 ppm BAP + 15% air kelapa) akan menghasilkan kalus kakao yang sangat cepat sedangkan medium tanpa air kelapa (medium MS + 2 ppm 2,4-D dan medium MS + 2 ppm 2,4-D + 0,2 ppm BAP) akan menghasilkan kalus yang sangat lama. Penelitian Naing (2011), menunjukkan pembentukan persentase kalus terbaik dihasilkan pada media MS yang diberi 2 mg/l BA yang ditambah 5% air kelapa. Persentase kalus *Coelogyne cristatta* yang terbentuk adalah 40%. Mohammad dan Mueen (2010) dalam

penelitiannya menunjukkan bahwa kombinasi 2,4-D 2 mg/l ditambah 10% air kelapa menghasilkan kalus *Cyamopsis tetragonolubus* terbaik sebesar 70%.

Hasil pengamatan kultur kalus pada eksplan tanaman anggur hijau (*V. Vinifera* L.) menunjukkan bahwa eksplan daun mampu menghasilkan kalus pada minggu ke-2 HST terhadap semua perlakuan yang diberikan yaitu pada media MS dengan pemberian hormone 2,4-D dan air kelapa dengan konsentrasi 10% dan kombinasi medium MS + 2,4-D 1,5 ppm + air kelapa 10% menunjukkan perlakuan yang paling baik dengan sel yang aktif membelah (Dwi, dkk., 2012).

Beberapa penelitian untuk induksi kalus *Andrographis paniculata* (sambiloto) telah dilakukan yakni penelitian Sharmila (2013), media MS dengan penambahan 2,4-D 0,5 mg/l menghasilkan berat kalus tertinggi yakni 40mg. Respon kalus terbaik pada penelitian Gandhi (2012), ialah pada media MS dengan 2,4-D 2 mg/l dikombinasi dengan 0,4 mg/l BAP dengan respon ++++. Kalus terbaik pada penelitian Martin (2004) adalah kalus yang diinduksi pada media MS dengan penambahan 2,4-D 4,52 μ m dikombinasi dengan 2,22 BA μ m menghasilkan berat kering kalus daun sambiloto sebesar 1735 mg.

2.8. Proses Perkembangan Makhluk Hidup Dalam Al-Qur'an

Proses perkembangan makhluk hidup telah disebutkan dalam Al-Qur'an. Beberapa ayat menyebutkan bagaimana proses itu terjadi. Beberapa ayat tersebut adalah sebagai berikut :

﴿طَبَقَ عَنْ طَبَقًا لَتَرْكَبَنَّ﴾

Artinya: “*Sesungguhnya kamu melalui tingkat demi tingkat (dalam kehidupan)*”(QS. Al-Insyqaaq/ 84:19).

Makna ayat di atas menurut Shihab (2002), semua mengalami perubahan sebagaimana manusia juga mengalami perubahan-perubahan dalam perjalanan hidupnya, karena dia *pasti mengalami tingkat demi tingkat*.

Adapun kata *thabaq* maka ia antara lain mengandung makna persamaan sesuatu atau situasi dengan sesuatu yang lain baik ia bertumpuk maupun tidak. Sahabat Nabi, Ibn ‘Abbas, memahami kalimat di atas dalam arti *ancaman menyangkut hari Kiamat* yakni, kamu akan mengalami situasi yang sulit setelah situasi sulit sebelumnya. Sahabat Nabi yang lain, Jabir Ibn ‘Abdillah memahami situasi dimaksud sebagai situasi kematian, Kebangkitan, dan kebahagiaan atau kesengsaraan (Shihab, 2002). Menurut Muhammad (2000), ayat di atas ditujukan kepada segenap manusia. Yakni, kamu melewati keadaan demi keadaan, artinya keadaan terus berubah, meliputi keadaan zaman dan tempat, kondisi badan dan hati.

Tubuh manusia juga diciptakan tahapan demi tahapan. Simaklah firman Allah berikut ini:

﴿يَمْزُ وَّهُوْ شَاءَ مَا خَلَقَ وَشَيْبَةً ضَعْفًا قُوَّةٍ يَعْدَمِ مِنْ جَعَلَ ثُمَّ قُوَّةً ضَعْفٍ يَعْدَمِ مِنْ جَعَلَ ثُمَّ ضَعْفٍ مِنْ خَلَقَكُمْ الَّذِي اللَّهُ

﴿الْقَدِيرُ الْعَلِيمُ﴾

Artinya: “*Allah, dialah yang menciptakan kamu dari keadaan lemah, Kemudian dia menjadikan (kamu) sesudah keadaan lemah itu menjadi kuat, Kemudian dia menjadikan (kamu) sesudah Kuat itu lemah (kembali) dan*

beruban. dia menciptakan apa yang dikehendaki-Nya dan dialah yang Maha mengetahui lagi Maha Kuasa”. (QS. Ar-Ruum/ 30:54)

Pada awalnya Anda adalah seorang anak kecil yang mungkin kedua kaki dan tanganmu bisa digenggam dengan satu tangan, engkau digendong dengan tangan tersebut dalam keadaan lemah. Kemudian lambat laun Anda menjadi kuat hingga tumbuh menjadi seorang pemuda yang gagah dan kuat. Kemudian apabila kekuatan itu sudah sempurna engkau menjadi lemah kembali. Sebagian ulama menyamakan keadaan tubuh dengan keadaan bulan. Pada awalnya yang tampak hanyalah bulan sabit yang kecil, lambat laun menjadi besar hingga sempurna cahayanya. Kemudian sedikit demi sedikit berkurang hingga menghilang. Kita memohon kepada Allah agar diberi *husnul khatimah* (Muhammad, 2000).

Surat Al-An'am ayat 95 juga menunjukkan bagaimana proses pertumbuhan itu terjadi, dimana berbunyi:

﴿تُؤَفِّكُونَ فَأَنَّى اللَّهُ ذَلِكُمْ الْحَيِّ مِنَ الْمَيِّتِ وَمُخْرِجِ الْمَيِّتِ مِنَ الْحَيِّ تَخْرِجُ وَالنَّوَى الْحَيِّ فَالِقُ اللَّهُ إِنَّ﴾

Artinya: “*Sesungguhnya Allah menumbuhkan butir tumbuh-tumbuhan dan biji buah-buahan. dia mengeluarkan yang hidup dari yang mati dan mengeluarkan yang mati dari yang hidup. (yang memiliki sifat-sifat) demikian ialah Allah, Maka Mengapa kamu masih berpaling?*” (QS. Al-An'am/ 6:95).

Maksud dari ayat di atas menurut tafsir Ibn Katsir (2007) adalah Allah menumbuhkan tumbuh-tumbuhan yang hidup dari biji dan benih, yang merupakan benda mati. Para ahli tafsir mengungkapkan tentang mengeluarkan yang hidup dari yang mati dan demikian pula sebaliknya, dengan berbagai macam ungkapan

yang semuanya saling berdekatan makna. Ada di antara mereka yang mengatakan: “Yaitu mengeluarkan ayam dari telur, atau sebaliknya.”

Allah SWT menyatakan, “Wahai manusia, sesungguhnya yang berhak disembah bukanlah apa yang kalian sembah, melainkan Allah yang telah menumbuhkan butir-butir, yakni memecahkan butir dari segala tumbuhan, lantas mengeluarkan tumbuhan darinya. Juga *annawa* (biji-bijian) dari segala tumbuhan berbiji, lantas mengeluarkan tumbuhan darinya. Allah SWT menjelaskan pula bahwa Dialah yang mengeluarkan tangkai yang hidup dari butir yang mati, dan mengeluarkan butir yang mati dari tangkai yang hidup. Dia juga yang mengeluarkan pohon yang hidup dari biji yang mati, dan biji yang mati dari pohon yang hidup. Pohon ketika masih bersiri dan belum kering, dinamakan *hayy* (hidup) oleh orang arab. Sedangkan jika telah kering dan batangnya telah runtuh, dinamakan *mayyit* (mati). Ini dapat digambarkan dengan “Pohon kurma berasal dari biji, dan biji berasal dari pohon kurma. Demikian pula butir, berasal dari tangkai (gandum), dan tangkai berasal dari butir (Muhammad, 2008).

“*Sesungguhnya Allah menumbuhkan butir tumbuh-tumbuhan dan biji buah-buahan...*” yakni Dia-lah yang menumbuhkan butir-butir biji dan menjadikan darinya tumbuh-tumbuhan bukan selain diri-Nya. Allah *Ta'ala* berfirman, “*...Dia mengeluarkan yang hidup dari yang mati...*” Dialah yang mengeluarkan tumbuh-tumbuhan yang hidup dari yang mati seperti ayam dari telurnya. “*...Dan yang mengeluarkan mati dari yang hidup*” Dialah yang mengeluarkan butir dari tumbuh-tumbuhan yang hidup, pohon kurma dan pepohonan yang lain dari biji-bijian yang mati, seperti keluarnya setets air mani

(*nuthfah*) yang mati dari yang hidup, yaitu manusia, dan keluarnya manusia yang hidup dari *nuthfah* yang mati atau seperti telur dari ayam (Al-Jazairi, 2007).

Menurut Al-Qurtubi (2008), kata الفلق artinya membelah biji buah-buahan yang mati, lalu mengeluarkan daun yang hijau darinya. Seperti itu juga dengan butir tumbuh-tumbuhan. Lalu, dari daun yang hijau itu Dia mengeluarkan butir tumbuh-tumbuhan yang mati dan biji buah-buahan. Ini juga merupakan makna Dia mengeluarkan yang hidup dari yang mati dan mengeluarkan yang mati dari yang hidup. Maksudnya adalah Allah mengeluarkan manusia yang hidup dari sperma yang mati dan sperma yang mati dari manusia yang hidup .

