

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Hari Munculnya Kalus Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees)

Hasil analisis varian menunjukkan bahwa konsentrasi 2,4-D memberikan pengaruh yang signifikan terhadap hari muncul kalus Sambiloto ($p = 0,00$), sehingga dilanjutkan dengan uji DMRT 5% (lampiran 5, tabel 4.1).

Tabel 4.1. Pengaruh auksin terhadap hari munculnya kalus Sambiloto (*Agrographis paniculata* Ness.)

Konsentrasi 2,4-D (mg/l)	Munculnya Kalus (hari)
0	0.00 a
1	26.67 c
2	18.44 b
3	17.11 b

Keterangan: Angka yang didampingi oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata pada uji DMRT α : 0.05

Berdasarkan hasil di atas, semakin besar konsentrasi 2,4-D maka, hari munculnya kalus lebih awal. Tanpa 2,4-D tidak mampu menginduksi kalus, sedangkan 2,4-D 1 mg/l mampu menginduksi kalus pada hari 26,67 setelah tanam, 2,4-D 2 mg/l mampu menginduksi kalus pada hari 18,44 setelah tanam dan 2,4-D 3 mg/l menginduksi kalus lebih cepat yakni pada hari 17,11 setelah tanam. Namun, 2,4-D 3 mg/l tidak berbeda nyata dengan hasil 2,4-D 2 mg/l.

Salah satu indikator adanya pertumbuhan dalam kultur *in vitro* adalah munculnya kalus yang ditandai dengan adanya bintik putih pada bagian sayatan eksplan (lampiran 6). Kalus yang terbentuk dikarenakan adanya perlakuan pada jaringan dan respon terhadap hormon maupun zat pengatur tumbuh (ZPT). Hal ini sesuai dengan Indah dan Dini (2013), menyatakan

bahwa munculnya kalus pada bagian yang terluka diduga karena adanya rangsangan dari internal jaringan pada eksplan untuk menutupi lukanya. Pembelahan sel yang mengarah pada terbentuknya kalus terjadi dari adanya respon terhadap luka dan suplai zat pengatur tumbuh dari luar ke dalam eksplan.

Pemilihan ZPT merupakan salah satu faktor yang sangat menentukan pembentukan kalus tanaman yang dikulturkan. 2,4-D merupakan ZPT yang paling sering digunakan pada kultur kalus karena memacu proses pembentukankalus serta menjaga pertumbuhan kalus. Menurut Indah dan Dini (2013), apabila dibandingkan dengan auksin lainnya seperti IAA, 2,4-D menunjukkan aktivitas yang lebih kuat. Aktivitas 2,4-D yang kuat dan optimal ini disebabkan karena gugus karboksil yang dipisahkan oleh karbon atau karbon dan oksigen (lihat gambar 2.5).

Berdasarkan hasil pengamatan, 2,4-D pada eksplan Sambiloto mampu menginduksi kalus. Hal ini sesuai dengan Widiarti (2009), 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 mensintesis kembali mineral dinding sel dan sitoplasma.

Kerja 2,4-D pada eksplan Sambiloto menyebabkan eksplan membentuk kalus. Ini dicirikan dengan tumbuhnya eksplan kemudian muncul

bintik putih yang merupakan sel yang terbentuk. Menurut Syahid dan Natalini (2007), 2,4-D merupakan auksin kuat yang sering digunakan secara tunggal untuk menginduksi terbentuknya kalus dari berbagai jaringan tanaman. Zat pengatur tumbuh ini juga efektif untuk inisiasi kalus. Menurut Rahayu (2002), penambahan 2,4-D dalam media akan merangsang pembelahan dan pembesaran sel pada eksplan sehingga dapat memacu pembentukan dan pertumbuhan kalus.

Hasil analisis variansi menunjukkan bahwa konsentrasi air kelapa memberikan pengaruh yang signifikan ($p = 0,00$) terhadap hari muncul kalus Sambiloto, sehingga dilanjutkan dengan uji DMRT 5% (lampiran 5, tabel 4.1).

Tabel 4.1. Pengaruh air kelapa terhadap hari munculnya kalus Sambiloto (*Agrographis paniculata* Ness.)

Konsentrasi Air Kelapa (%)	Munculnya Kalus (Hari)
10	15.67 b
15	17.25 c
20	13.75 a

Keterangan: Angka yang didampingi oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata pada uji DMRT $\alpha: 0.05$

Berdasarkan hasil di atas, pengaruh hari munculnya kalus berbeda-beda pada setiap perlakuan. Air kelapa 10 % mampu menginduksi kalus pada hari 15,67 setelah tanam, air kelapa 15 % mampu menginduksi kalus pada hari 17,25 setelah tanam dan air kelapa 20 % menginduksi kalus paling cepat yakni pada hari 13,75 setelah tanam.

Air kelapa memiliki manfaat untuk meningkatkan pertumbuhan tanaman (Pishesha, 2008). George dan Sherington (1984) dalam Pishesha

(2008), menyatakan bahwa air kelapa mengandung asam organik, asam nukleotida, purin, gula, alcohol, vitamin, zat pengatur tumbuh dan mineral. Senyawa penting bagi kultur jaringan yang terdapat dalam air kelapa adalah zat pengatur tumbuh. Hormon sitokinin pada air kelapa berfungsi untuk menunjang pertumbuhan eksplan. Menurut Kristina dan Sitti (2012), Air kelapa mengandung ZPT alami yang termasuk dalam golongan sitokinin yakni 1,3 diphenilurea, zeatin, zeatin glukosida, dan zeatin ribosida. Menurut Indah dan Dini (2013), pemberian sitokinin dalam kultur kalus berperan penting dalam memicu pembelahan dan pemanjangan sel sehingga dapat mempercepat perkembangan dan pertumbuhan kalus.

Penggunaan air kelapa dalam penelitian ini digunakan sebagai hormon alami yang diharapkan mampu untuk menginduksi kalus daun Sambiloto. Ini terbukti air kelapa dengan konsentrasi 10 %, 15 %, dan 20 % mampu membentuk kalus meski dengan perbedaan hari disetiap perlakuan.

Hasil analisis variansi menunjukkan bahwa perlakuan 2,4-D yang dikombinasikan dengan air kelapa berpengaruh nyata terhadap rata-rata waktu inisiasi terbentuknya kalus Sambiloto karena signifikansi ($p = 0,00$) yang menunjukkan bahwa adanya pengaruh interaksi antara 2,4-D dengan air kelapa, sehingga dilanjutkan dengan uji DMRT 5 % (lampiran 5). Hasil ini dapat dilihat pada tabel 4.1.

Tabel 4.1. Pengaruh interaksi antara 2,4-D dengan air kelapa terhadap hari muncul kalus Sambiloto (*Agrographis paniculata* Ness.)

2,4-D (mg/l) + Air kelapa (%)	Hari Muncul Kalus
0 + 10	0.00* a
0 + 15	0.00* a
0 + 20	0.00* a
1 + 10	29.33 d
1 + 15	29.67 d
1 + 20	21.00 c
2 + 10	17.00 b
2 + 15	21.67 c
2 + 20	16.67 b
3 + 10	16.33 b
3 + 15	17.67 b
3 + 20	17.33 b

Keterangan: Angka yang didampingi oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata pada uji DMRT α : 0.05, *: eksplan tidak terbentuk kalus

Tabel 1 menunjukkan bahwa kalus Sambiloto lebih cepat tumbuh pada media MS dengan perlakuan 2,4-D 3 mg/l yang dikombinasikan dengan air kelapa 10% yaitu kalus dapat dibentuk pada hari ke 16,33 setelah tanam. Namun, hasil ini tidak berbeda nyata dengan perlakuan auksin 2 mg/l yang dikombinasikan dengan air kelapa 10% yang mampu membentuk kalus pada hari ke 17 setelah tanam. Media MS yang ditambahkan dengan auksin 1 mg/l dikombinasikan dengan air kelapa 15% mampu membentuk kalus pada 29, 67 hari setelah tanam dimana, perlakuan ini menginduksi kalus sangat lambat. Sedangkan media yang hanya ditambahkan dengan air kelapa dengan konsentrasi 10%, 15%, dan 20% tanpa diberi 2,4-D (0 mg/l) tidak mampu menghasilkan kalus hingga minggu ke empat setelah tanam.

Pemberian 2,4-D 3 mg/l yang dikombinasikan dengan air kelapa 10% menunjukkan hasil yang optimal terhadap pembentukan kalus. Di dalam air kelapa terkandung Diphenil urea yang mempunyai aktivitas seperti sitokinin

yaitu mempunyai aktivitas sebagai *promote* pembelahan sel. Sebab, air kelapa adalah endosperma cair yang terbentuk setelah terjadi pembuahan atau peleburan diri antara inti sperma dengan inti sel telur, sehingga menghasilkan sebuah zygote atau embryo yang kelak akan menjadi tanaman baru (Hendaryono dan Wijayanti, 1994). Air kelapa juga mengandung 1,3 diphenilurea, zeatin, zeatin glukosida, dan zeatin ribosida yang merupakan golongan dari sitokinin (Armini, *et al.*, 1992 dalam Kristina dan Sitti, 2012). Penelitian lebih lanjut menemukan bahwa efek air kelapa pada pertumbuhan kalus akan menjadi lebih baik, bila dalam media juga diberikan auksin. Auksin tertentu dan air kelapa dapat bersifat sinergis (Panjaitan, 2003). Dalam penelitian ini 2,4-D sebagai auksin dengan konsentrasi 3 mg/l mampu bersinergis dengan baik dengan air kelapa sebagai sumber sitokinin dengan konsentrasi 10%.

Kandungan beberapa hormon dan mineral pada air kelapa serta adanya 2,4-D mampu menunjang pertumbuhan kalus Sambiloto. Allah menjelaskan dalam surat Al-Furqon ayat 2 yang menjelaskan bahwa Allah menciptakan segala sesuatu dimuka bumi ini sesuai dengan ukuran. Menurut Ibnu Katsir (2007), maksud dari ayat tersebut adalah segala sesuatu selain Allah telah diciptakan-Nya dengan ukuran yang berbeda dan sesuai dengan ukurannya masing-masing yang menandakan bahwa memiliki fungsi dan peran yang berbeda-beda pula. Berikut ini firman Allah Al-Furqon/ 25: 2:

رَهُ شَيْءٍ كُلٌّ وَخَلَقَ الْمَلَكِ فِي شَرِيكَ لَهُ، يَكُنْ وَلَمْ يَلِدْ أَيَّتْ خِذْ وَلَمْ يَأَلَّأَرْضِ السَّمَوَاتِ مُلْكُهُ، الَّذِي

تَقْدِيرًا فَقَدَ

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.”* (QS. Al-Furqon/ 25: 2)

Perlakuan A1D0 (ak 10% + auk 0 mg/l) dan A2D0 (ak 15% + auk 0 mg/l) A3D0 (ak 20% + auk 0 mg/l) menunjukkan adanya pencoklatan pada eksplan hingga minggu ke-4 tidak menunjukkan tanda-tanda pertumbuhan. Eksplan pada perlakuan tersebut mengalami pencoklatan dan kemudian membusuk (lampiran 6). Kematian eksplan dengan kondisi mencoklat atau browning disebabkan oleh senyawa fenol yang dihasilkan eksplan mengalami oksidasi. Hendaryono dan Wijayanti (1994) menyatakan bahwa senyawa fenol akan teroksidasi membentuk quinon yang memiliki sifat racun terhadap sel-sel tanaman dan dapat menyebabkan kematian pada sel-sel tanaman tersebut.

Penggunaan air kelapa secara tunggal pada konsentrasi 10%, 15%, dan 20% tidak mampu memberikan respon terhadap inisiasi kalus. Hal tersebut diduga sel-sel tanaman belum mampu meningkatkan kemampuan jaringan untuk melakukan diferensiasi membentuk kalus. Kalus yang tidak muncul ini dimungkinkan karena kombinasi ZPT pada air kelapa belum mampu menginduksi kalus. Dimana, pemberian air kelapa saja tidak cukup untuk menginduksi kalus Sambiloto sehingga dibutuhkan tambahan ZPT lain untuk membentuk kalus. Terlihat disini bahwa proses induksi kalus untuk Sambiloto membutuhkan pasokan auksin eksogen yang cukup tinggi yakni

2,4-D 3mg/l, karena diduga kandungan auksin endogen dalam jaringan tanaman rendah. Walaupun pemberian auksin secara eksogen cukup tinggi, respon induksi baru bisa terjadi bila adanya kombinasi dengan air kelapa pada konsentrasi 10 %.

Eksplan pada minggu ke dua setelah tanam pada perlakuan A2D1, A3D1, A1D2, A2D2, A3D2, A1D3, A2D3 dan A3D3 mulai nampak bintik putih (lihat lampiran 6) dibagian pinggir daun yang tersayat. Bintik putih ini akan bertambah hingga membentuk kalus. Kalus merupakan proliferasi massa sel yang belum terdeferensiasi dan terdiri dari sel yang tidak teratur.(Indah dan Dini, 2013). Yusnita (2013) menambahkan bahwa pada umumnya kalus itu berasal dari satu sel. Menurut Wardani (2004), bahwa bintik putih yang hanya nampak sedikit akan berkembang menjadi beberapa bintik putih dalam satu kesatuan yang membentuk kalus. Namun, hari munculnya kalus berbeda-beda pada setiap perlakuan. Kombinasi 2,4-D 3 mg/l dengan air kelapa 10% merupakan kombinasi yang optimal dalam menginduksi kalus Sambiloto karena dalam waktu 16, 33 hari mampu membentuk kalus. Namun, untuk lebih efisien maka kombinasi 2,4-D 2 mg/l dengan air kelapa 10% dapat digunakan karena pada hari ke 17 eksplan mampu membentuk kalus. Hasil tersebut tidak berbeda nyata dengan kombinasi 2,4-D 3 mg/l dengan air kelapa 10%. Induksi pembelahan sel dapat terjadi bila penggunaan sitokinin bersama auksin. Pembelahan sel yang disebabkan oleh sitokinin dapat membentuk kalus dan mendorong proses embryogenesis somatik.

4.2. Persentase Eksplan Yang Terbentuk Pada Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees)

Hasil analisis variansi menunjukkan bahwa konsentrasi 2,4-D memberikan pengaruh yang signifikan ($p = 0,00$) terhadap persentase eksplan berkalus Sambiloto, sehingga dilanjutkan dengan uji DMRT 5% (lampiran 5, tabel 4.2).

Tabel 4.2. Pengaruh auksin terhadap persentase pertumbuhan kalus Sambiloto (*Agrographis paniculata* Ness.)

Konsentrasi 2,4-D	Persentase Eksplan Berkalus (%)
0 mg/l	0.0000 a
1 mg/l	100 c
2 mg/l	77.78 b
3 mg/l	88.89 bc

Keterangan: Angka yang didampingi oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata pada uji DMRT $\alpha: 0.05$

Berdasarkan hasil di atas, 2,4-D memberikan pengaruh dalam persentase tumbuhnya kalus. Media yang tidak diberi 2,4-D tidak mampu membentuk kalus. 2,4-D konsentrasi 1 mg/l mampu membentuk kalus mencapai 100 %, sedangkan 2,4-D konsentrasi 2 mg/l mampu membentuk kalus sebesar 77,78 %, dan 2,4-D 3 mg/l mampu membentuk kalus mencapai 88,89 %.

Hasil di atas menunjukkan 2,4-D mampu menunjang pertumbuhan eksplan hingga membentuk kalus. Tanda kalus tumbuh yakni terbentuknya bintik putih (lihat lampiran 6) yang merupakan sel pada bagian yang disayat kemudian akan membentuk sekumpulan sel yang tidak teratur. Pemberian

2,4-D 1 mg/l mampu membentuk kalus hingga 100 %. Kalus merupakan jaringan yang amorphous (tidak berbentuk atau belum terdiferensiasi) yang terbentuk ketika sel tanaman mengalami pembelahan yang tidak teratur. Menurut Zulkarnain (2009), terbentuknya kalus merupakan akibat dari perlukaan pada permukaan eksplan dan pengaruh perlakuan zat pengatur tumbuh yang diberikan pada media kultur. Menurut Kartikasari (2013), 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.

Hasil analisis variansi menunjukkan bahwa konsentrasi air kelapa memberikan pengaruh yang signifikan ($p = 0,00$) terhadap hari muncul kalus Sambiloto, sehingga dilanjutkan dengan uji DMRT 5% (lampiran 5, tabel 4.2).

Tabel 4.2. Pengaruh air kelapa terhadap persentase pertumbuhan kalus Sambiloto (*Agrographis paniculata* Ness.)

Konsentrasi Air Kelapa	Persentase Eksplan Berkalus (%)
10 %	69.45 b
15 %	58.33 a
20 %	72.22 b

Keterangan: Angka yang didampingi oleh huruf yang sama pada kolom yang bersesuaian tidak berbeda nyata pada uji DMRT α : 0.05

Media yang diberi air kelapa 10 % mampu membentuk kalus sebesar 69,45 %, sedangkan air kelapa 15 % mampu membentuk kalus sebesar 58,33 % dan air kelapa 20 % mampu membentuk kalus sebesar 72,22 %.

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 diperoleh tanaman dari atmosfer dalam bentuk CO₂ 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. Menurut Sitorus, dkk (2011), hal tersebut membuktikan bahwa sukrosa merupakan komponen penting yang harus tersedia dalam media kultur jaringan tumbuhan. Oleh karena itu nutrisi sangat diperlukan untuk pertumbuhan kalus. Ketersediaan unsur hara pada media juga mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan kalus, salah satu unsur hara yang penting adalah karbon. Menurut Netty (2002) *dalam* Kristina dan Sitti (2012) air kelapa merupakan air alami steril mengandung kadar K dan Cl tinggi. Selain itu, air kelapa mengandung sukrosa, fruktosa, dan glukosa. Berdasarkan literatur tersebut, sukrosa, fruktosa, dan glukosa merupakan sumber energi yang penting untuk pertumbuhan kalus.

Air kelapa memiliki banyak nutrisi yang dapat menunjang pertumbuhan kalus. Atas kehendak Allah SWT kalus dapat tumbuh. Air sangat dibutuhkan dalam kehidupan makhluk hidup. Surat Yasin/ 36: 34 menjelaskan mengenai pentingnya air, ayat tersebut adalah sebagai berikut:

﴿الْعُيُونِ مِنْ فِيهَا وَفَجَّرْنَا وَأَعْنَبِ ثَمِيلٍ مِّنْ جَنَّتِ فِيهَا وَجَعَلْنَا﴾

Artinya: “Dan kami jadikan padanya kebun-kebun kurma dan anggur dan kami pancarkan padanya beberapa mata air.”(QS. Yaasin/ 36: 34)

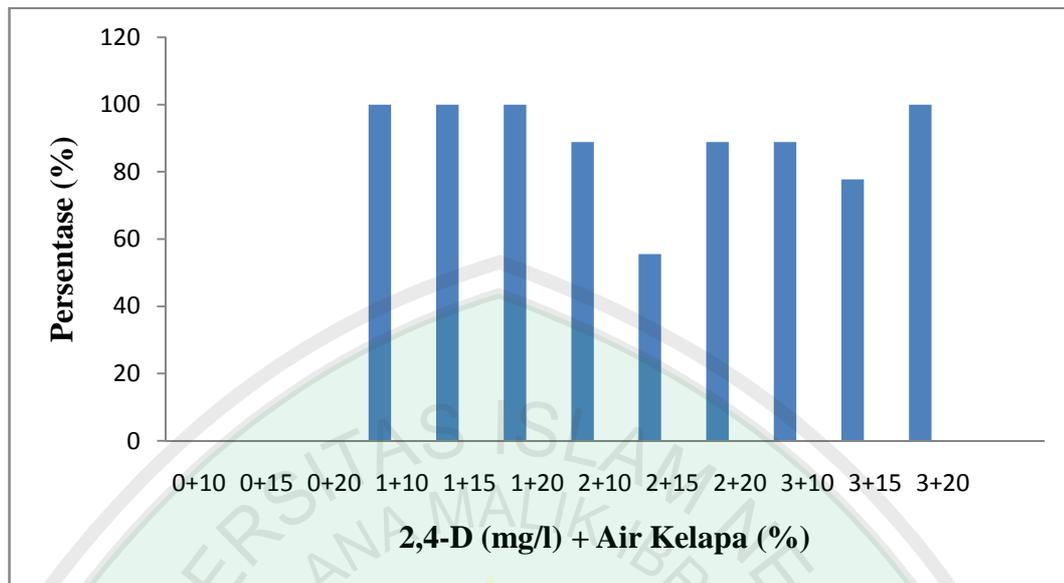
Menurut Hamka (1981) menafsirkan ayat tersebut, bahwa Allah SWT menciptakan air itu karena air adalah penyebab adanya hidup di muka bumi ini, baik manusia atau binatang, atau serangga, apalagi ikan dan sekalian yang tumbuh, semuanya tersebut air.

Sukrosa yang ditambahkan dalam media akan berfungsi sebagai bahan baku dalam proses respirasi oleh sel-sel eksplan untuk dapat melakukan aktivitas sel (Kimbal, 1994). Sukrosa dalam media akan dihidrolisis menjadi glukosa dan fruktosa. Glukosa akan mengalami penguraian melalui respirasi sel yang akan menghasilkan karbon dan energi. Energi ini akan digunakan oleh sel-sel eksplan untuk menutupi luka yang terjadi dengan cara membentuk kalus. Pemberian sukrosa dengan konsentrasi yang semakin meningkat akan menjamin ketersediaan sumber energi bagi sel untuk dapat tumbuh. Pada media dengan sukrosa yang konsentrasinya lebih kecil, sumber energinya akan lebih cepat habis seiring dengan pertumbuhan sel, sehingga sel tidak dapat melakukan pertumbuhan lagi (Sitorus, dkk., 2011). Sumber energi dalam media eksplan Sambiloto berasal dari air kelapa yang mengandung glukosa, sukrosa maupun fruktosa serta berasal dari penambahan gula pada media. Sehingga, media memiliki ketersediaan karbon yang cukup untuk nutrisi pertumbuhan eksplan Sambiloto. Karbon merupakan komponen penting bagi

senyawa-senyawa penyusun sel seperti karbohidrat, lipid, protein dan asam nukleat (Campbell *et al.*, 2003). Jika sumber karbon mencukupi maka komponen-komponen sel ini akan terbentuk cepat, waktu inisiasi kaluspun akan lebih cepat sehingga sel akan mempunyai kesempatan untuk membelah lebih optimal. Pembelahan sel yang optimal akan menyebabkan pertumbuhan kalus yang optimal dan akan meningkatkan berat basah kalus

Kultur jaringan membutuhkan nutrisi yang cukup untuk menunjang pertumbuhan dan perkembangan eksplan. Air kelapa mengandung nutrisi yang cukup untuk pertumbuhan dan perkembangan kalus. Berdasarkan data di atas maka, pemberian air kelapa 10 % adalah konsentrasi yang efektif untuk menginduksi kalus dibanding dengan air kelapa 20 % karena hasilnya tidak berbeda nyata.

Hasil analisis variansi menunjukkan bahwa perlakuan 2,4-D yang dikombinasikan dengan air kelapa tidak berpengaruh terhadap rata-rata persentase kalus Sambiloto yang terbentuk karena signifikan ($p=142$) sehingga tidak dilakukan uji DMRT 5 %. Berikut adalah histogram hasil berat kalus pada perlakuan 2,4-D yang dikombinasikan dengan air kelapa (gambar 4.2).



Gambar 4.2 Histogram pengaruh konsentrasi 2,4-D yang dikombinasikan dengan air kelapa terhadap persentase pertumbuhan kalus Sambiloto (*Agrographis paniculata* Ness.)

Semua perlakuan kombinasi antara 2,4-D dengan air kelapa mampu membentuk kalus hingga lebih dari 50%. Sedangkan media yang hanya diberi air kelapa dengan konsentrasi 10%, 15% dan 20% tidak mampu membentuk kalus (0%). Persentase pembentukan kalus terbaik adalah pada perlakuan auksin 1 mg/l + 10% air kelapa, auksin 1 mg/l + 15% air kelapa, auksin 1 mg/l + air kelapa 20% dan auksin 3 mg/l + air kelapa 20% yang mencapai 100%.

Nutrisi pada perlakuan A1D0 (ak 10% + auk 0 mg/l), A2D0 (ak 15% + auk 0 mg/l) dan A3D0 (ak 20% + auk 0 mg/l) tidak mencukupi untuk pertumbuhan eksplan sambiloto sehingga eksplan tidak mampu membentuk kalus. Nutrisi yang ada pada air kelapa saja tidak mampu membentuk kalus pada perlakuan tersebut, ini dapat dilihat dari hasil persentase tumbuhnya

mencapai 0 %. Hal ini diduga pula, karena kombinasi konsentrasi ZPT yang diberikan pada eksplan tidak tepat dalam menginduksi kalus, sehingga menghambat pertumbuhan kalus pada eksplan. Terhambatnya pembentukan kalus dikarenakan hormon endogen dan eksogen yang terdapat pada eksplan tidak dapat merangsang pertumbuhan kalus dengan cepat.

Pembentukan kalus terjadi karena adanya pelukaan yang diberikan pada eksplan, sehingga sel-sel pada eksplan akan memperbaiki sel-sel yang rusak tersebut. Pada awalnya terjadi pembentangan dinding sel dan penyerapan air, sehingga sel akan membengkak selanjutnya terjadi pembelahan sel (Sitorus, dkk., 2011). Penambahan auksin dan air kelapa ke dalam media akan merubah keseimbangan zat pengatur tumbuh endogen, dimana keseimbangan yang terjadi akan berpengaruh terhadap besarnya penyerapan nutrisi yang tersedia dalam media kultur, sehingga secara langsung dapat mempengaruhi besarnya daya tahan eksplan kalus untuk hidup pada media tersebut. Eksplan yang hidup dicirikan dengan keadaan warna eksplan yang masih berwarna hijau, tidak terkontaminasi, tidak mengering, dan tidak mengalami pencoklatan.

Eksplan pada perlakuan yang hanya diberi air kelapa yakni sebesar 10%, 15% dan 20% tanpa auksin tidak dapat tumbuh dan eksplan berwarna coklat serta mulai membusuk. Ini disebabkan tidak ada promotor yang cukup untuk memicu reaksi biokimia guna pembelahan sel. Media mempunyai fungsi untuk menyuplai nutrisi dan untuk mengarahkan pertumbuhan melalui zat pengatur tumbuh. Kombinasi zat pengatur tumbuh yang ditambahkan ke

dalam medium merupakan faktor utama penentu keberhasilan kultur *in vitro*. Zat pengatur tumbuh (ZPT) yang sering digunakan untuk menginduksi pembentukan kalus adalah auksin. Pemberian sitokinin dalam kultur kalus berperan penting dalam memicu pembelahan dan pemanjangan sel sehingga dapat mempercepat perkembangan dan pertumbuhan kalus. Menurut Indah dan Dini (2013), kalus juga mengeluarkan persenyawaan-persenyawaan hasil metabolisme yang akhirnya akan menghambat pertumbuhan kalus itu sendiri.

Interaksi antara 2,4-D dan air kelapa pada konsentrasi yang tepat mampu menginduksi kalus dengan prosentase hingga 100% yakni pada perlakuan A3D3 (ak 20% + auk 3 mg/l) A3D1 (ak 20% + auk 1 mg/l) dan A2D1 (ak 15% + auk 1 mg/l) dan A1D1 (ak 10% + auk 1 mg/l) . Dengan 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. Sedangkan air kelapa yang mengandung banyak nutrisi menunjang pertumbuhan dan perkembangan kalus menjadi lebih maksimal dibanding dengan perlakuan yang hanya diberi air kelapa.

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).

4.3. Berat Kalus Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees)

Berat kalus diukur pada hari ke-28 (minggu ke-4). Hasil analisis variansi menunjukkan bahwa konsentrasi 2,4-D memberikan pengaruh yang signifikan ($p = 0,00$) terhadap berat basah kalus Sambiloto, sehingga dilanjutkan dengan uji DMRT 5% (lampiran 5, tabel 4.3).

Tabel 4.3. Pengaruh auksin terhadap berat kalus (gram) Sambiloto (*Angrographis paniculata* Ness.)

Konsentrasi 2,4-D	Berat Kalus (gram)
0 mg/l	0.00000 a
1 mg/l	0.06144 b
2 mg/l	0.06478 b
3 mg/l	0.07089 b

Keterangan: Angka yang didampingi oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata pada uji DMRT $\alpha: 0.05$

Perlakuan 2,4-D 1 mg/l memiliki berat rata-rata 0,06144 gram, sedangkan 2,4-D konsentrasi 2 mg/l memiliki berat rata-rata 0,06478 gram dan 2,4-D 3 mg/l memiliki berat rata-rata 0,07089 gram.

Pertumbuhan adalah peningkatan permanen ukuran organisme atau bagian dari tumbuhan yang merupakan hasil dari peningkatan jumlah dan

ukuran sel. Pertumbuhan dicirikan dengan bertambahnya berat yang *irreversible*, sehingga pengukuran berat segar kalus dapat mewakili variabel pertumbuhan kalus. Berat basah kalus yang besar ini disebabkan karena kandungan airnya yang tinggi. Berat basah yang dihasilkan sangat tergantung pada kecepatan sel-sel tersebut membelah diri, memperbanyak diri dan dilanjutkan dengan membesarnya kalus (Indah dan Dini, 2013). Berat basah yang juga merupakan salah satu penanda pertumbuhan, dalam penelitian ini tidak ada beda yang signifikan. Ini dapat dikarenakan pembentukan kalus yang kurang maksimal. Pembentukan yang kurang maksimal bisa dikarenakan beberapa faktor baik komposisi media, lamanya waktu inisiasi, suhu maupun cahaya lingkungan.

2,4-D ditambahkan dalam penelitian ini dikarenakan peran 2,4-D yang penting yakni mendorong proses morfogenesis kalus, induksi kalus dan dapat mempengaruhi kestabilan genetik sel tanaman. Kalus yang terbentuk pada perlakuan ini, dipengaruhi oleh adanya auksin dan sitokinin dengan perbandingan yang tepat dan sesuai akan mendukung pertumbuhan kalus. Di dalam sel, 2,4-D diduga mempengaruhi metabolisme RNA, yang mengontrol metabolisme protein, yang kemungkinan dilakukan pada proses transkripsi molekul RNA (Maftuchah, dkk., 1998 *dalam* Rahayu, dkk., 2003). Kenaikan sintesis protein menyebabkan bertambahnya sumber tenaga untuk pertumbuhan (Rahayu, dkk., 2003). Kehadiran air kelapa pada eksplan sambilan juga memberikan nutrisi yang cukup untuk membentuk kalus. Setelah kalus mampu dibentuk oleh interaksi antara 2,4-D dengan air kelapa

maka, pertumbuhan dan perkembangan selanjutnya didukung oleh nutrisi yang tersedia pada media. Air kelapa sendiri mengandung beberapa nutrisi penting.

Sedangkan air kelapa tidak memberi pengaruh, ini berdasarkan hasil ANAVA (Lampiran 5) dimana signifikansi ($p = 0,900$). Sehingga hasil perhitungan ANAVA tidak diuji lanjut dengan DMRT. Arah perkembangan kultur ditentukan oleh interaksi dan perimbangan antara zat pengatur tumbuh yang diproduksi oleh sel tanaman secara endogen, sebab di dalam eksplan itu sendiri sebenarnya sudah ada zat pengatur tumbuh endogen, tapi dalam pertumbuhan dan perkembangan tanaman secara *in vitro* zat pengatur tumbuh eksogen masih ditambahkan. Namun, dalam berat kalus Sambiloto, air kelapa tidak memberikan pengaruh.

Berat kalus ditimbang pada minggu ke empat. Data berat kalus dianalisis menggunakan analisis varian (ANAVA). Berdasarkan uji ANAVA (lampiran 5) menunjukkan bahwa hasil interaksi antara 2,4-D yang dikombinasikan air kelapa memberikan pengaruh terhadap berat kalus karena signifikansi ($p = 0,43$) (tabel 4.3). Data tersebut telah ditransformasikan menggunakan transformasi kuadrat.

Rata-rata berat basah kalus Sambiloto yang lebih besar dihasilkan pada media MS yang diberi auksin 1 mg/l yang dikombinasikan dengan air kelapa 15% yakni sebesar 0.08533 gram. Tetapi hasil tersebut tidak berbeda nyata dengan perlakuan 2,4-D 3 mg/l yang dikombinasikan dengan air kelapa 20 %.

Tabel 4.3. Pengaruh 2,4-D yang dikombinasikan dengan air kelapa terhadap berat kalus Sambiloto (*Angrographis paniculata* Ness.)

2,4-D (mg/l) + Air kelapa (%)	Berat Kalus (gram)
0 + 10	0.00000* a
0 + 15	0.00000* a
0 + 20	0.00000* a
1 + 10	0.05000 b
1 + 15	0.08533 c
1 + 20	0.04900 b
2 + 10	0.07600 bc
2 + 15	0.05767 bc
2 + 20	0.06067 bc
3 + 10	0.07100 bc
3 + 15	0.06000 bc
3 + 20	0.08167 c

Keterangan: Keterangan: Angka yang didampingi oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata pada uji DMRT α : 0.05, *: tidak terbentuk kalus

Diduga bahwa interaksi antara auksin 1 mg/l yang dikombinasikan dengan air kelapa 15% mampu mendorong sel-sel membelah dan membesar sehingga membentuk kalus lebih cepat. Berat basah kalus yang besar ini disebabkan karena kandungan airnya yang tinggi. Berat basah yang dihasilkan sangat tergantung pada kecepatan sel-sel tersebut membelah diri, memperbanyak diri dan dilanjutkan dengan membesarnya kalus. Menurut Pishesha (2008), interaksi auksin dan sitokinin dalam kultur *in vitro* mampu membuat sel-sel pada jaringan tanaman mengalami proses pembelahan dan pembesaran.

Auksin meningkatkan kuantitas sel-sel embriogenik dengan cara memacu pembelahan sel untuk membentuk massa proembriogenik, serta mencegah inisiasi pertumbuhan yang teratur pada sel-sel tersebut (Ibrahim,

dkk., 2010). Pertumbuhan sendiri berkaitan dengan penambahan volume dan jumlah sel sehingga terbentuklah protoplasma baru yang menyebabkan penambahan berat. Menurut Rahayu, dkk., (2003), Pengaruh auksin terhadap pertumbuhan jaringan diduga menginduksi sekresi ion H^+ keluar melalui dinding sel. Pengasaman dinding sel menyebabkan K^+ diambil, pengambilan ini mengurangi potensial air dalam sel akan membesar. Kecepatan sel membelah diri juga dipengaruhi oleh adanya kombinasi antara auksin dan sitokinin dalam konsentrasi tertentu, selain itu ada beberapa faktor yang juga mempengaruhi cepat atau lambatnya tumbuh kalus diantaranya adalah, ketersediaan unsur hara, karbohidrat, cahaya, pH, suhu dll.

Perlakuan yang hanya diberi air kelapa yakni pada perlakuan A1D0 (ak 10% + auk 0 mg/l), A2D0 (ak 15% + auk 0 mg/l) dan A3D0 (ak 20% + auk 0 mg/l) tidak mampu membentuk kalus sehingga berat basah tidak dapat diukur. Tidak mampunya eksplan dalam membentuk kalus dikarenakan komposisi media yang kurang sesuai. Dimana, air kelapa mengandung sitokinin tinggi dan rendah auksin. Sedangkan auksin diperlukan pada saat awal pertumbuhan kalus. Menurut Rahayu, dkk (2003), penambahan 2,4-D dalam media akan merangsang pembelahan dan pembesaran sel pada eksplan sehingga dapat memacu pembentukan dan pertumbuhan kalus. Penelitian ini auksin yang digunakan adalah 2,4-D. Ketidakhadiran 2,4-D dalam media A1D0, A2D0, dan A3D0 mengakibatkan eksplan Sambiloto tidak mampu membentuk kalus. Dimana, tidak terbentuknya bintik putih pada bagian eksplan yang disayat hingga minggu ke empat. Eksplan yang tidak mampu

tumbuh mengakibatkan kematian karena eksplan tidak mampu melakukan aktifitas metabolismenya untuk melakukan pertumbuhan dan perkembangan lebih lanjut.

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). Nutrisi yang cukup banyak terutama unsur karbon dalam air kelapa mampu menunjang pertumbuhan eksplan Sambiloto hingga membentuk kalus. Adanya interaksi antara 2,4-D dengan air kelapa juga menunjang pertumbuhan eksplan menjadi kalus. Interaksi yang paling efisien dalam hasil berat kalus adalah pada perlakuan 2,4-D 1 mg/l yang dikombinasikan dengan air kelapa 15 % yakni sebesar 0.08533 gram.

4.4. Morfologi Kalus Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees)

4.4.1. Warna Kalus

Pengamatan pada minggu ke empat diperoleh hasil bahwa eksplan Sambiloto (*Agrographis paniculata* Ness.) dengan beberapa perlakuan memberikan hasil warna kalus yang bervariasi. Warna kalus merupakan salah satu indikator dalam teknik kultur jaringan karena pada tiap eksplan akan menghasilkan warna kalus yang berbeda-beda, adapun data perubahan warna kalus disajikan pada tabel 4.4.1.

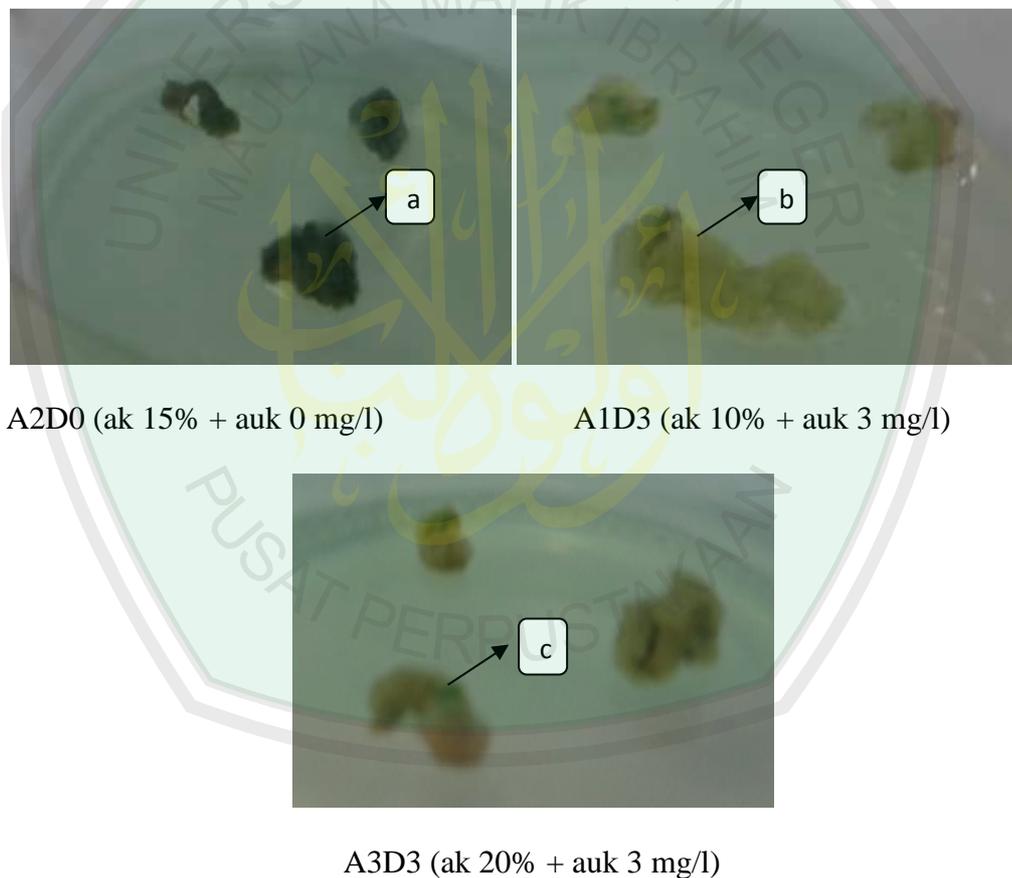
Tabel 4.4.1 Perubahan warna kalus Sambiloto

2,4-D (mg/l) + Air kelapa (%)	Warna Kalus
0 + 10	- *
0 + 15	- *
0 + 20	- *
1 + 10	HK
1 + 15	HK
1 + 20	HK
2 + 10	HB
2 + 15	HK
2 + 20	HK
3 + 10	HK
3 + 15	HB
3 + 20	HB

Keterangan: H: Hijau Bening, Hk: Hijau kekuningan, *: Tidak terbentuk kalus

Warna eksplan kecoklatan terdapat pada perlakuan yang hanya diberikan air kelapa tanpa 2,4-D, baik air kelapa dengan konsentrasi 10%, 15%, maupun 20%. Warna kecoklatan pada kalus ini dikenal dengan istilah *browning* yang diakibatkan adanya metabolisme senyawa fenol bersifat berlebihan, yang sering terangsang akibat proses sterilisasi

eksplan. Menurut Indah dan Dini (2013), peristiwa pencoklatan tersebut sesungguhnya merupakan suatu peristiwa alamiah dan proses perubahan adaptif bagian tanaman akibat adanya pengaruh fisik seperti pengupasan, dan pemotongan. Gejala pencoklatan merupakan tanda-tanda terjadinya kemunduran fisiologis eksplan. Berikut adalah gambar hasil inisiasi kalus selama empat minggu (gambar 4.4.1.)



Gambar 4.4.1. a: kalus tidak terbentuk dan berwarna coklat, b: kalus berwarna hijau kekuningan, c: kalus berwarna hijau bening

Perkembangannya, kalus mulai jelas terbentuk dan warnanya setelah tiga minggu dalam kultur media. Kalus yang mulai membesar

berbentuk bulat dengan warna transparan, kemudian berkembang menjadi beberapa warna, yaitu kekuningan, hijau bening hingga hijau kekuningan. Warna inti kalus yang dihasilkan dari media pembentukan kalus yaitu putih dan hijau. Kalus muda berwarna putih, kemudian warnanya akan berubah menjadi hijau dengan bertambahnya umur. Perbedaan warna kalus ini disebabkan adanya perubahan pigmentasi. Kalus yang terbentuk pada perlakuan 2,4-D yang dikombinasikan dengan air kelapa memiliki warna hijau bening dan hijau kekuningan. Baik pemberian kombinasi 2,4-D (1 mg/l, 2 mg/l dan 3mg/l) dengan air kelapa (10%, 15% dan 20%). Terbentuknya bagian hijau pada kalus merupakan awal terjadinya morfogenesis (Pishesha, 2008). Warna kalus mengindikasikan keberadaan klorofil dalam jaringan, semakin hijau warna kalus semakin banyak pula kandungan klorofilnya. Penggunaan auksin dapat membentuk klorofil dalam kalus (Dwi, dkk., 2012).

Auksin akan menyebabkan pengenduran dinding sel dan pengaktifan enzim pemutus ikatan hydrogen rantai selulosa dinding sel, dan diduga sitokinin mendorong terjadinya sintesis material membrane dan dinding sel (Panjaitan, 2003). Penumbuhan eksplan Sambiloto secara *in vitro* menghasilkan warna kalus yang berbeda. Perbedaan warna kalus menunjukkan tingkat perkembangan dari kalus. Warna hijau pada kalus mengindikasikan kandungan klorofil yang tinggi dalam jaringan kalus Sambiloto. Warna putih pada kalus menunjukkan bahwa kalus mengandung amilum(pati) dan belum terdapat klorofil.

Kalus yang terbentuk berawal dari bintik putih yang kemudian berkembang menjadi beberapa bintik putih hingga membentuk kalus. Sebagian bintik putih akan berubah menjadi kehijauan. Menurut Ariati (2012), kalus yang berwarna putih merupakan jaringan embrionik yang belum mengandung kloroplas, tetapi memiliki kandungan butir pati yang tinggi. Warna kalus mengidentifikasi keberadaan klorofil dalam jaringan, semakin hijau warna kalus semakin banyak pula kandungan klorofilnya dalam kalus (Dwi, 2012). Pembentukan klorofil juga dipengaruhi oleh keberadaan zat pengatur tumbuh.

Semakin tinggi konsentrasi 2,4-D yang ditambahkan dalam media mempengaruhi penurunan kandungan klorofil dan karoten. Penurunan kandungan klorofil ini diduga terjadi karena pengaruh auksin pada metabolisme karbohidrat (Rahayu, 2003). Penggunaan 2,4-D pada tanaman dapat mengganggu metabolisme karbohidrat. Sintesis klorofil dipengaruhi oleh karbohidrat yang merupakan zat pokoknya (Mille, 1995 dalam Rahayu, 2003). Sehingga, apabila metabolisme karbohidrat terganggu maka sintesis klorofil juga akan terganggu.

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). Kehadiran sitokinin pada air kelapa mampu membentuk warna hijau pada eksplan Sambiloto. Sehingga, interaksi antara 2,4-D dengan air kelapa pada eksplan Sambiloto bagus untuk membentuk kalus berwarna hijau. Warna yang hijau ini menandakan bahwa kalus masih aktif mengalami pembelahan. Kalus yang berwarna hijau bening hingga hijau kekuningan ini dapat digunakan untuk bahan penghasil metabolit sekunder. Dalam penelitian Dandin dan Hosakatte (2012) maupun Sharmila (2013), yang menggunakan bahan daun Sambiloto sebagai eksplan menghasilkan kalus berwarna hijau pucat hingga kekuningan dan kalus tersebut mampu menghasilkan senyawa andrograpolit.

4.4.2. Tekstur Kalus

Indikator lain untuk mengamati pertumbuhan kalus adalah berupa tekstur kalus. Sehingga dapat diketahui kalus yang masih aktif membelah atau mati. Tekstur kalus merupakan salah satu penanda yang dipergunakan untuk menilai pertumbuhan suatu kalus. Pengamatan tekstur kalus diamati pada minggu ke-4. Tabel tekstur kalus dapat dilihat pada tabel 4.4.2.

Berdasarkan pada tabel 4.4.2. pada semua kombinasi perlakuan yakni pemberian 2,4-D (1 mg/l, 2mg/l dan 3mg/l) yang dikombinasikan dengan air kelapa (10%, 15% dan 20%) memberikan hasil kalus yang

berbentuk kompak. Tekstur kompak tersebut dicirikan dengan struktur yang padat dan berair. Pemberian auksin dan sitokinin pada eksplan sambiloto mampu membentuk struktur kalus yang kompak.

Tabel 4.4.2 Tekstur kalus yang terbentuk setelah 4 minggu

2,4-D (mg/l) + Air kelapa (%)	Tekstur Kalus
0 + 10	-*
0 + 15	-*
0 + 20	-*
1 + 10	Kompak
1 + 15	Kompak
1 + 20	Kompak
2 + 10	Kompak
2 + 15	Kompak
2 + 20	Kompak
3 + 10	Kompak
3 + 15	Kompak
3 + 20	Kompak

Keterangan: Ak: Air kelapa, *: tidak terbentuk kalus

Kalus merupakan jaringan yang amorphous (tidak berbentuk atau belum terdiferensiasi) yang terbentuk ketika sel tanaman mengalami pembelahan yang tidak teratur (Zulkarnain ,2009). Kalus yang mulai tumbuh ditandai dengan membengkaknya eksplan terutama bagian irisan eksplan yang bersentuhan langsung dengan mediadan munculnya bintik-bintik berwarna putih, setelah itu teksturnya menjadi agak kasar.

Tekstur kalus pada semua perlakuan menunjukkan kalus yang kompak. Menurut Hartmann dan Kester dalam Katuuk (1989)dalamSharmila (2013), terjadi pembelahan sel hanya pada bagian meristematik pada bagian luar, tidak berlangsung pada seluruh bagian

eksplan, setelah pembelahan sel bagian luar berkurang, maka kalus akan kelihatan membulat atau kompak.

Tekstur kalus juga dipengaruhi oleh adanya zat pengatur tumbuh. Menurut Dwi, dkk (2012) menyatakan bahwa, kalus yang diinduksi dari tunas dengan penambahan sitokinin memiliki tekstur yang lebih kompak daripada kalus yang dihasilkan tanpa induksi sitokinin. Tekstur 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. Sehingga penggunaan air kelapa sangat bermanfaat dalam pembentukan tekstur kalus.

Perlakuan yang hanya diberikan dengan air kelapa (10%, 15%, dan 20%) tanpa 2,4-D (0 mg/l) tidak mampu membentuk kalus. Bahkan eksplan mati pada minggu ke empat. Eksplan mati tersebut dicirikan dengan berwarna coklat dan mulai membusuk. Menurut Ariati, dkk (2012) kalus yang bersifat embrionik adalah kalus yang memiliki sel berukuran kecil, sitoplasma padat, inti besar, vakuola kecil dan mengandung butiran pati. Pengamatan sel kalus dari eksplan Sambiloto menunjukkan adanya aktivitas pembelahan sel pada beberapa perlakuan (tabel 4.3.2.). Tekstur kalus yang dihasilkan kompak. Jika dihubungkan dengan tekstur kalus maka, menurut Ariati (2012), kalus yang memiliki tekstur yang kompak umumnya memiliki ukuran sel kecil dengan sitoplasma padat, inti besar dan memiliki banyak pati gandum (karbohidrat). Menurut Indah dan Dini

(2013) kalus yang baik untuk digunakan sebagai bahan penghasil metabolit sekunder yaitu memiliki tekstur kompak (*non friable*).

Berdasarkan literatur Indah dan Dini (2013) maka, kalus sambiloto yang bertekstur kompak ini baik untuk bahan penghasil metabolit sekunder. Dimana, hasil metabolit sekunder yang paling dominan pada Sambiloto adalah Andrographolit. Pembentukan metabolit sekunder sendiri juga dikarenakan beberapa faktor. Terbentuknya kalus yang bertekstur kompak menurut Indah dan Dini (2013) dipacu oleh adanya hormon auksin endogen yang diproduksi secara internal oleh eksplan yang telah tumbuh membentuk kalus tersebut. Pemberian zat pengatur tumbuh dapat mempengaruhi produksi metabolit sekunder, hal ini disebabkan ZPT yang ditambahkan dapat menyebabkan perubahan fisiologi dan biokimia tumbuhan melalui pengaturan kerja enzim. 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.

Aktivitas 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 biomassa kalus yang akhirnya dapat meningkatkan berat kalus (Azriati, 2010). ZPT kemudian akan meningkatkan sintesis protein sebagai bahan baku penyusun enzim yang

nantinya dapat memacu kerja enzim dalam proses metabolisme tubuh. Hasil pengikatan ini mengaktifkan enzim tersebut dan mengubah substrat menjadi beberapa produk baru. Produk baru yang terbentuk ini menyebabkan serentetan reaksi-reaksi sekunder salah satunya adalah pembentukan metabolit sekunder.

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

Kultur in vitro adalah suatu metode untuk mengisolasi potongan jaringan tanaman dari kondisi alami pada media nutrisi dalam kondisi aseptik, dalam hal ini 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) (Azriati, dkk., 2010). Surat al-An'am ayat 95 menjadi dasar penelitian kultur in vitro.

﴿تُؤَفِّكُونَ فَأَنَّى اللَّهُ ذَلِكُمْ أَحْيَىٰ مِنَ الْمَيِّتِ وَمُخْرَجُ الْمَيِّتِ مِنَ الْحَيِّ مُخْرَجُ النَّوَىٰ الْحَبِّ 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 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.”

Menurut Al-Qurtubi (2008), makna ayat tersebut adalah 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.

Bahan tanam dalam kultur *in vitro* atau kultur jaringan disebut eksplan yang berasal dari bagian tanaman tersebut. Manusia dapat menanam bagian dari tumbuhan seperti daun yang digunakan sebagai eksplan dalam penelitian ini, eksplan ditanam pada agar yang merupakan benda mati. Media agar mengandung beberapa nutrisi yang merupakan komponen-komponen kimiawi. Komponen kimiawi tersebut merupakan benda mati. Namun, mampu menunjang pertumbuhan eksplan hingga menjadi kalus. Berdasarkan ayat di atas, menunjukkan bahwa atas kehendak Allah lah eksplan yang ditanam akan tumbuh dengan baik. Sebagai manusia hanya mampu berusaha seraya berdoa untuk kesejahteraan manusia itu sendiri dan tidak hanya memanfaatkan kenikmatan pada bumi ini sebesar-besarnya tanpa adanya upaya pelestarian.

Kandungan ayat di atas menurut Al-Maraghi (1992), kata يخرج yang berarti mengeluarkan memiliki makna tersendiri bagi tumbuhan. Jika diperhatikan proses perkembangan tumbuhan secara garis besar maka mengeluarkan memiliki arti bahwasannya Allah menumbuhkan tumbuh-tumbuhan tersebut di atas tanah baik dimulai dari benih, biji ataupun tunas sehingga menjadi tumbuh-tumbuhan yang bermacam-macam jenisnya.

Perkembangan eksplan Sambiloto menjadi kalus ditunjukkan dari beberapa perlakuan. Daun Sambiloto yang merupakan eksplan dalam penelitian ini, awalnya belum memiliki kehidupan. Eksplan mulai nampak adanya pertumbuhan dan perkembangan pada hari tertentu setelah tanam. Atas kehendak Allah eksplan daun Sambiloto mampu tumbuh. Awalnya hanya berupa potongan-potongan daun kecil yang diletakkan dalam media tanam dengan beberapa komposisi nutrisi, atas kuasa Allah eksplan tumbuh dengan baik. Pembentukan kalus diawali dengan adanya pembengkaan pada eksplan kemudian sayatan eksplan bergelombang bahkan eksplan mampu menggulung. Eksplan yang ditanam akan menunjukkan tanda-tanda kehidupannya lebih lanjut dengan menunjukkan adanya pembekakan eksplan dan disusul dengan keluarnya bintik-bintik putih pada bagian eksplan yang dilukai. Pertumbuhan eksplan melalui beberapa tahapan yakni dari kalus hingga menjadi tanaman dewasa (planlet). Proses pertumbuhan dan perkembangan eksplan melalui beberapa tahapan. Ayat berikut juga menjelaskan mengenai proses kehidupan terjadi.

﴿طَبَّقْ عَنِ طَبَقًا لَتَرْكَبُنَ﴾

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*. 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.

Dalam konteks tumbuhan kalimat tersebut dapat diartikan bahwa segala sesuatu itu tidak langsung berkembang menjadi dewasa, semuanya mengalami beberapa tahapan dalam pertumbuhan. Seperti halnya kalus juga mengalami tahapan pertumbuhan, dimana kalus terbentuk karena adanya eksplan yang berasal dari jaringan meristematik yang mengalami luka, karena adanya zat pengatur tumbuh auksin yang menyebabkan sel pada eksplan tersebut mengalami pemanjangan sel yang tidak diikuti dengan pembelahan sel sehingga menyebabkan terbentuknya kalus. Setelah kalus terbentuk maka kalus tersebut beregenerasi menjadi embrio lalu muncullah planlet (tanaman dewasa). Ayat di bawah ini juga menjelaskan mengenai proses perkembangan dan pertumbuhan terjadi.

أَمْ مَا خَلَقْنَا وَشِيبَةَ ضَعْفًا قَوَّةٍ بَعْدَ مِنْ جَعَلْنَا قُوَّةً ضَعْفٍ بَعْدَ مِنْ جَعَلْنَا مِنْ خَلْقِكُمْ الَّذِي اللَّهُ
 الْقَدِيرُ الْعَلِيمُ وَهُوَ شَدِيدُ

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)

Menurut Muhammad (2000), ayat tersebut menjelaskan mengenai pada awalnya kita adalah seorang anak kecil yang mungkin kedua kaki dan tangan bisa digenggam dengan satu tangan, engkau digendong dengan tangan tersebut dalam keadaan lemah. Kemudian lambat laun kita menjadi kuat hingga tumbuh menjadi seorang pemuda yang gagah dan kuat. Kemudian apabila

kekuatan itu sudah sempurna kita 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*.

Pertumbuhan eksplan pada kultur *in vitro* dimulai dengan adanya beberapa bintik putih pada bagian eksplan yang terluka lalu tumbuh dan berkembang menjadi beberapa bintik putih yang diketahui bintik putih tersebut adalah sel. Sekumpulan sel tersebut dinamakan kalus. Menurut Indah dan Dini (2013) kalus merupakan proliferasi massa sel yang belum terdeferensiasi dan terdiri dari sel yang tidak teratur. Kultur kalus merupakan kultur sekumpulan sel yang tidak terorganisir yang berasal dari berbagai jaringan tumbuhan. Pertumbuhan kalus dapat digambarkan dalam bentuk kurva sigmoid. Phillips (1995) membagi lima fase pertumbuhan kalus, yaitu:

1. fase lag, dimana sel-sel mulai membelah
2. fase eksponensial, dimana laju pembelahan sel berada pada puncaknya
3. fase linier, pembelahan sel mengalami perlambatan tetapi laju ekspansi sel meningkat
4. fase deselerasi, laju pembelahan dan pemanjangan sel menurun
5. fase stasioner, dimana jumlah dan ukuran tetap

Sesuai dengan ayat di atas yang menjelaskan bahwa kehidupan dimulai dari awal yang lemah dan lambat laun akan menjadikan kokoh hingga menjadi lemah kembali. Keadaan ini digambarkan dengan pertumbuhan dan

perkembangan manusia yang dimulai dari anak kecil yang lemah hingga menjadi sesosok yang dewasa. Keadaan ini juga terjadi pada pertumbuhan eksplan. Eksplan tumbuh dari keadaan lemah hingga menjadikan dia kokoh kemudian menjadi lemah lagi. Sesuai dengan fase pertumbuhan eksplan yang dimulai dari fase *lag*, *eksponensial*, *linier*, *deselerasi* dan *stasioner*. Begitu pula dengan eksplan Sambiloto pada penelitian ini. Pertumbuhan dimulai dari terbentuknya bintik putih yang merupakan awal terbentuknya sel. Kemudian sel terus membelah hingga menjadi sekumpulan sel yang tidak teratur dinamakan kalus. Kalus terus mengalami pertumbuhan namun tidak mengalami penambahan jumlah sel. Pertumbuhan di lanjutkan dengan terjadinya perubahan warna kalus. Kalus pada waktu tertentu akan mengalami penurunan laju pertumbuhan dengan adanya tanda-tanda kalus mulai berubah warna dan tidak mengalami penambahan massa sel dan kemudian kalus akan mengalami kematian dalam waktu tertentu apabila kondisi internal maupun eksternal tidak mendukung adanya pertumbuhan.