

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pengaruh Jenis Eksplan dan Konsentrasi IBA Terhadap Pertumbuhan dan Perkembangan Kalus Purwoceng (*Pimpinella alpine* Molk.)

4.1.1 Pembentukan Kalus Purwoceng

Data hari muncul kalus yang diperoleh dianalisis dengan analisis variansi (ANOVA) untuk mengetahui adanya pengaruh jenis eksplan dan konsentrasi IBA. Hasil ANOVA menunjukkan bahwa jenis eksplan tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap hari muncul kalus karena F hitung lebih kecil daripada F tabel, sedangkan konsentrasi IBA memberikan pengaruh yang signifikan terhadap hari muncul kalus Purwoceng karena F hitung $>$ F tabel dengan signifikansi 0.05, sehingga dilanjutkan dengan uji DMRT 5% (tabel 4.1).

Tabel 4.1 Pengaruh Konsentrasi IBA terhadap hari muncul kalus Purwoceng (*Pimpinella alpine*) setelah tanam

Konsentrasi IBA (mg/l)	Hari muncul kalus (HST)
0	-
3	10,3 a
5	15,0 b
7	16,7 b

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

Purwoceng merupakan tanaman herba yang memiliki berbagai manfaat, akan tetapi keberadaannya telah langka sehingga dalam penelitian ini dilakukan usaha untuk melestarikan Purwoceng dengan cara perbanyakan

secara *in vitro*. Eksplan dalam penelitian ini adalah daun dan tangkai daun yang dilukai bagian tepinya agar dapat terbentuk kalus. Hendaryono (1994) menyebutkan, ketika tanaman dilukai maka kalus akan terbentuk akibat selnya mengalami outolisis (pemecahan), dari sel tersebut dihasilkan senyawa yang merangsang pembelahan sel di lapisan berikutnya sehingga terbentuk gumpalan sel. Eksplan diamati setiap hari untuk mengetahui hari pembentukan kalus yang dinyatakan sebagai hari setelah tanam (HST). Data hari pembentukan kalus pertama kali dapat diamati dalam tabel 4.1.

Q.S. al- Fath (48) ayat 29 menjelaskan bahwa Allah menumbuhkan tanaman awalnya hanya sebagian dari tanaman tersebut yang berupa tunas kemudian berkembang dan tumbuh menjadi tanaman yang kokoh.

مُحَمَّدٌ رَسُولُ اللَّهِ ۗ وَالَّذِينَ مَعَهُ أَشِدَّاءُ عَلَى الْكُفَّارِ رُحَمَاءُ بَيْنَهُمْ ۖ تَرَاهُمْ رُكَّعًا سُجَّدًا يَبْتَغُونَ فَضْلًا مِّنَ اللَّهِ وَرِضْوَانًا سِيمَاهُمْ فِي وُجُوهِهِمْ مِّنْ أَثَرِ السُّجُودِ ۗ ذَٰلِكَ مَتْلُوهُمْ فِي التَّوْرَةِ ۗ وَمَثَلُهُمْ فِي الْإِنْجِيلِ كَرَزَعٍ أُخْرِجَ شَطْعُهُ فَتَازَرَهُ فَاسْتَعْلَظَ فَاسْتَوَىٰ عَلَىٰ سُوْقِهِ ۗ يُعْجَبُ الزُّرَّاعُ لِيَغِيظَ بِهِمُ الْكُفَّارَ ۗ وَعَدَّ اللَّهُ الَّذِينَ ءَامَنُوا وَعَمِلُوا الصَّالِحَاتِ مِنْهُمْ مَغْفِرَةً وَأَجْرًا عَظِيمًا ﴿٢٩﴾

Artinya: “Muhammad adalah utusan Allah dan orang-orang yang bersama dengan Dia adalah keras terhadap orang-orang kafir, tetapi berkasih sayang sesama mereka. kamu Lihat mereka ruku' dan sujud mencari karunia Allah dan keridhaan-Nya, tanda mereka tampak pada muka mereka dari bekas sujud. Demikianlah sifat-sifat mereka dalam Taurat dan sifat-sifat mereka dalam Injil, Yaitu seperti tanaman yang mengeluarkan tunasnya Maka tunas itu menjadikan tanaman itu kuat lalu menjadi besarlah Dia dan tegak Lurus di atas pokoknya; tanaman itu menyenangkan hati penanam-penanamnya karena Allah hendak menjenjalkan hati orang-orang kafir (dengan kekuatan orang-orang mukmin). Allah menjanjikan kepada orang-orang yang beriman dan mengerjakan amal yang saleh di antara mereka ampunan dan pahala yang besar”. (QS. al- Fath/48: 29)

Ayat di atas menjelaskan bahwasanya Allah menciptakan segala sesuatu yang ada di bumi ini melalui sebuah proses, salah satunya adalah penciptaan tumbuhan. Pada proses penciptaannya, Allah menumbuhkan tumbuhan dengan cara mengeluarkannya dari sebuah biji kemudian tumbuh tunas dan menjadi tanaman yang besar dan kokoh. Seperti halnya dalam makna ayat di atas berbunyi “*tanaman yang mengeluarkan tunasnya Maka tunas itu menjadikan tanaman itu kuat lalu menjadi besarlah Dia dan tegak Lurus di atas pokoknya*” potongan ayat tersebut merupakan salah satu gambaran dalam penelitian ini yang mana dilakukan proses penumbuhan tanaman yang berasal dari tunas berupa daun dan tangkai daun yang muda.

Kalimat **يَخْرُجُ** dalam ayat di atas memiliki arti “mengeluarkan”, Allah telah menciptakan tanaman dengan cara mengeluarkannya dari sebutir biji kemudian membentuk tunas dan akar muda, kemudian tanaman tersebut tumbuh dan menjadi kokoh. Tunas yang muncul pada tanaman sebagai tempat pembentukan makanan melalui fotosintesis kemudian akar sebagai penopang tanaman, mengambil mineral dan sari makanan dalam tanah. Segala yang ada di alam semesta ini diciptakan Allah melalui sebuah proses yang membentuk suatu jaringan yang memiliki fungsi saling berhubungan.

Pembentukan kalus pada eksplan menurut Krisnamoorthy (1981) dalam Astutik (2007) diawali dengan membesarnya sel epidermis bagian atas kemudian sel tersebut membelah. Gunawan (1987) dalam Astutik (2007) menambahkan, dalam jaringan yang membentuk kalus pembelahan sel tidak terjadi pada semua sel (jaringan asal), tetapi hanya sel di lapisan peripheral

yang membelah terus-menerus, sedangkan sel yang ditengah tetap quisent. Hal ini yang menyebabkan pembentukan kalus terjadi pada kedua ujung atau bagian tengah eksplan yang sebelumnya telah terjadi pembengkakan.

Pengamatan hari pertama setelah tanam, eksplan semua perlakuan belum menunjukkan perubahan. Hari kelima, eksplan daun dari IBA 3 mg/l dan 5 mg/l menunjukkan perubahan. Perubahan berupa pembengkakan eksplan (penambahan ukuran). Pada hari ketujuh daun mulai menggulung dan membesar, sedangkan daun pada IBA 0 mg/l dan 7 mg/l belum menunjukkan perubahan, hanya membengkak belum menggulung sedangkan eksplan petiol dari semua konsentrasi belum menunjukkan perubahan.

Eksplan daun pada IBA 3 mg/l membentuk kalus 10 hari setelah tanam, sedangkan IBA 5 mg/l pada hari ke-15 setelah tanam dan IBA 7 mg/l pada 18 hst. Pembentukan kalus diawali dengan pembengkakan kemudian menggulung dan terbentuk kalus dari bagian ujung eksplan yang mengalami perlukaan. Eksplan pada IBA 0 mg/l tidak menunjukkan perubahan atau tanda muncul kalus. Hasil tersebut menunjukkan IBA memiliki pengaruh pada pertumbuhan kalus Purwoceng, baik eksplan daun maupun petiol.

Eksplan petiol pada IBA 3 mg/l muncul kalus pada hari ke-10 hst, IBA 5 mg/l pada hari ke-14 hst dan IBA 7 mg/l pada 15 hst. Pembentukan kalus petiol awalnya muncul dari kulit yang pecah (lapisan luar mengelupas) dan membentuk perlukaan kemudian muncul kalus dari perlukaan. Petiol Purwoceng berupa sukulen (berair dan lunak) sehingga mudah mengalami

perluasan akibat interaksi sel penyusunnya. Petiol pada IBA 0 mg/l tidak menunjukkan pembentukan kalus sampai pengamatan minggu ke-8.

Eksplan petiol dalam media IBA 7 mg/l pada penelitian ini membutuhkan waktu lebih lama untuk membentuk kalus yaitu 18 hst. Hal ini diduga disebabkan konsentrasi IBA yang diberikan pada eksplan termasuk tinggi sehingga dapat menghambat pembentukan kalus. Pada kadar yang tinggi, auksin lebih bersifat menghambat daripada merangsang pertumbuhan (Hendaryono dan Wijayani, 1994). Semakin tinggi zat pengatur tumbuh IBA yang digunakan maka pertumbuhan kalus pada eksplan akan semakin lama.

Penelitian Harahap (2005) menunjukkan, auksin dengan konsentrasi tinggi (≤ 5 mg/l) menghasilkan kalus paling lama yaitu 5 minggu setelah tanam sedangkan auksin dengan konsentrasi lebih rendah (1-3 mg/l) muncul kalus 1-2 minggu setelah tanam. Dengan konsentrasi yang sesuai maka akan menghasilkan pertumbuhan yang optimal. Allah menciptakan segala sesuatu sesuai dengan ukurannya seperti tertera dalam Q.S al-Qamar (54) ayat 49:

إِنَّا كُلَّ شَيْءٍ خَلَقْنَاهُ بِقَدَرٍ ﴿٤٩﴾

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

Eksplan pada IBA 0 mg/l (kontrol) tidak terjadi pembentukan kalus, hal ini disebabkan unsur hara dalam media belum mampu menginduksi terbentuknya kalus. Adanya ZPT pada media adalah salah satu faktor yang menentukan terbentuknya kalus. Hal ini didukung oleh Watimena (1992) yang menyatakan ZPT adalah salah satu faktor penting diantara faktor lain yang dapat mempengaruhi pertumbuhan baik jenis maupun konsentrasinya.

4.1.2 Persentase Eksplan Berkalus

Data persentase eksplan dianalisis menggunakan analisis variansi (ANOVA) untuk mengetahui adanya pengaruh jenis eksplan dan konsentrasi IBA terhadap persentase pertumbuhan kalus Purwoceng. Hasil ANOVA menunjukkan bahwa ada pengaruh yang signifikan dari jenis eksplan dan konsentrasi IBA terhadap persentase pertumbuhan kalus Purwoceng karena $F_{hitung} > F_{tabel}$, sehingga dilanjutkan dengan uji DMRT 5% (Tabel 4.2).

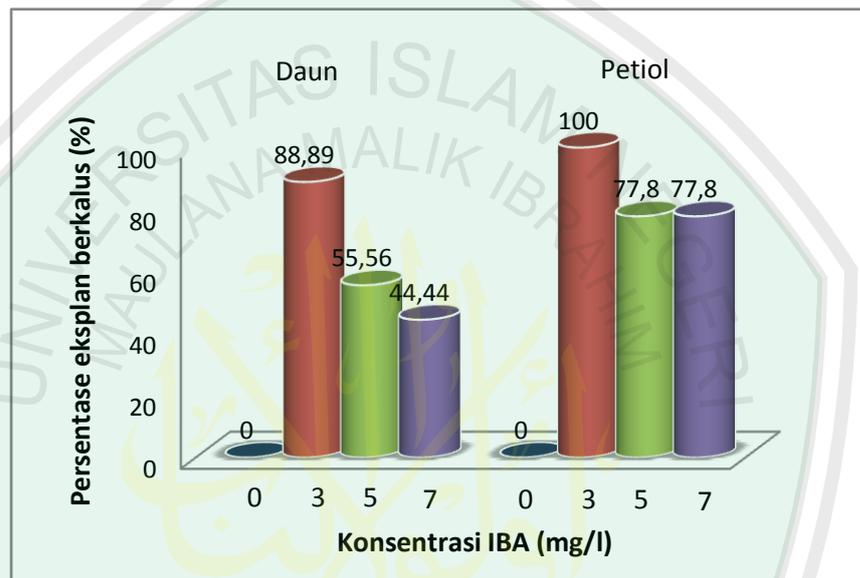
Tabel 4.2 Pengaruh Jenis Eksplan dan Konsentrasi IBA terhadap persentase pertumbuhan kalus Purwoceng

No.	Eksplan	Konsentrasi IBA (mg/l)	Persentase kalus (%)
1.	Daun	0	0.00 a
		3	76.34 cd
		5	48.25 bc
		7	41.75 b
2.	Petiol	0	0.00 a
		3	87.13 d
		5	69.83 bcd
		7	65.55 bcd

Keterangan: 1. Angka yang didampingi oleh huruf yang sama pada kolom yang bersesuaian tidak berbeda nyata pada uji DMRT $\alpha : 0.05$
 2. Data ditransformasi menggunakan transformasi arcsin

Hasil penelitian dan analisis variansi menunjukkan, jenis eksplan dan konsentrasi IBA berbeda memberikan pengaruh yang berbeda terhadap pembentukan kalus. Pengaruh perlakuan terhadap pembentukan kalus bervariasi. Hal ini dapat dilihat dari persentase pembentukan kalus setelah 8 minggu pengamatan. Eksplan daun pada IBA konsentrasi 0 mg/l membentuk kalus dengan persentase 0 %, IBA 3 mg/l 88.89%, IBA 5 mg/l 55.56%, IBA

7 mg/l 44,4%. Eksplan petiol pada konsentrasi IBA 0 mg/l membentuk kalus 0%, IBA 3 mg/l persentase eksplan membentuk kalus sebesar 100%, IBA 5 mg/l persentase eksplan berkalus adalah 77,8% sedangkan untuk IBA 7 mg/l eksplan mampu membentuk kalus 77,8% (Gambar 4.1).



Gambar 4.1 Persentase eksplan berkalus Purwoceng (*Pimpinella alpina*)

Pada penelitian ini hasil persentase eksplan berkalus yang tertinggi yaitu pada IBA 3 mg/l sedangkan persentase terendah yaitu IBA 7 mg/l, hal ini diduga disebabkan oleh konsentrasi IBA yang digunakan cukup tinggi sehingga dapat menghambat pertumbuhan kalus. Hendaryono dan Wijayani (1994) menyatakan bahwa ZPT dengan dosis yang terlalu tinggi bersifat menghambat pertumbuhan kalus daripada merangsang pertumbuhan kalus.

Tingginya konsentrasi auksin dapat menghambat pemanjangan sel itu sendiri, karena auksin yang tinggi dapat memicu meningkatnya konsentrasi etilen. Hal ini sesuai dengan pernyataan Ayabe dan Sumi (1998)

dalam Karjadi dan Buchory (2007), semakin tinggi konsentrasi auksin maka konsentrasi etilen yang dihasilkan akan semakin tinggi pula. Hal ini akan menyebabkan terhambatnya aktivitas auksin dalam perpanjangan sel, tetapi akan meningkatkan pelebaran sel, etilen merupakan inhibitor bagi pemanjangan sel apabila dalam media terdapat auksin dengan konsentrasi tinggi. Hal tersebut dapat memicu terjadinya proses penuaan (*mature*) tanpa melalui pertumbuhan kalus terlebih dahulu, sehingga pertumbuhan kalus menjadi terhambat atau bahkan tidak tumbuh kalus sama sekali.

Perbedaan persentase tumbuhnya kalus mengindikasikan adanya pengaruh jenis eksplan dan konsentrasi IBA dalam pembentukan kalus Purwoceng. Perbedaan kemampuan pembentukan kalus ini menurut Komatsuda (1991) dalam Dian (2005) karena perbedaan kondisi fisiologis jaringan eksplan yang digunakan dan perbedaan kompetensi regenerasi.

Munculnya kalus pada bagian perlukaan karena adanya rangsangan dari jaringan pada eksplan untuk menutupi lukanya. Hal ini sesuai pendapat dari Thomas dan Davey (1975) dalam George and Sherington (1993), bahwa pembelahan sel yang mengarah pada terbentuknya kalus terjadi dari adanya respon terhadap luka dan suplai hormon alamiah atau buatan dari luar ke dalam eksplan. Hal ini membuktikan bahwa terbentuknya kalus sangat dipengaruhi oleh peran ZPT. Menurut Zulfiqar (2009) kondisi tersebut membuktikan bahwa pertumbuhan dan morfogenesis tanaman secara *in vitro* dikendalikan oleh keseimbangan dan interaksi dari hormon (ZPT) dalam eksplan baik endogen maupun eksogen yang diserap dari media.

Daun dan petiol digunakan sebagai sumber eksplan kemudian ditanam dalam media sehingga menghasilkan tanaman baru. Hal tersebut terbukti dari persentase pertumbuhan kalus pada eksplan, sehingga dapat diketahui bahwasanya benda mati dalam hal ini yaitu media dapat memiliki manfaat dan menghasilkan suatu kehidupan dengan seizin Allah, seperti firmanNya dalam Q.S al-An'am (6) ayat 95:

﴿ إِنَّ اللَّهَ فَالِقُ الْحَبِّ وَالنَّوَىٰ ۗ يُخْرِجُ الْحَيَّ مِنَ الْمَيِّتِ وَمُخْرِجُ الْمَيِّتِ مِنَ الْحَيِّ ۗ ذَٰلِكُمْ ۗ اللَّهُ ۗ فَإِنِّي تُؤَفِّكُونَ ۗ ﴾

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)

Ayat di atas tersirat makna bahwasanya makhluk hidup yang ada di muka bumi ini berasal dari yang tidak hidup, misalnya dalam penelitian ini adalah tanaman. Pada awalnya segala sesuatu yang ada di bumi ini berasal dari benda mati, seperti halnya pada penelitian ini yang menggunakan media tanam yang berasal dari benda mati kemudian dapat menghasilkan kalus yang lama-lama dapat menjadi sebuah tanaman yang sempurna.

Ayat di atas menunjukkan kepada kesempurnaan, kekuasaan, keindahan dan kebijaksanaan Allah. Dia mengeluarkan tumbuhan yang tidak berbatang atau yang berbatang, sedang ia makan dan tumbuh, dari yang mati, yakni tidak makan dan tidak tumbuh, seperti tanah, biji, benih, dan lain-lain. Para ahli genetika mengungkapkan bahwa “pada asal makhluk hidup ada kehidupan, setiap yang tumbuh dari jenis biji maupun benih mempunyai

kehidupan yang tersimpan. Dia mengeluarkan yang mati dari yang hidup, seperti mengeluarkan biji dan benih dari tumbuhan, telur, dan *nutfah* dari hewan (Maragi, 1992). Az-Zajaj mengatakan, Dia (Allah) mengeluarkan tumbuh-tumbuhan yang segar dari biji yang kering.

4.1.3 Morfologi Kalus

4.1.3.1 Warna Kalus

Pada pengamatan selama 8 minggu didapatkan hasil bahwa eksplan daun dan petiol Purwoceng (*Pimpinella alpina*) pada IBA 0, 3, 5 dan 7 mg/l memberikan pengaruh warna kalus yang bervariasi (Tabel 4.3).

Tabel 4.3 Perubahan warna kalus pada minggu ke-2 dan ke-8

No.	Jenis Eksplan	Konsentrasi IBA (mg/l)	Warna kalus	
			Awal	Akhir
1.	Daun	0	-	-
		3	H	Hk
		5	Hk	Kc
		7	Hk	C
2.	Petiol	0	-	-
		3	H	H
		5	H	H
		7	Hk	Kc

Keterangan:

H : Hijau bening

Kc : Kuning kecoklatan

Hk : Hijau kekuningan

C : Coklat bening

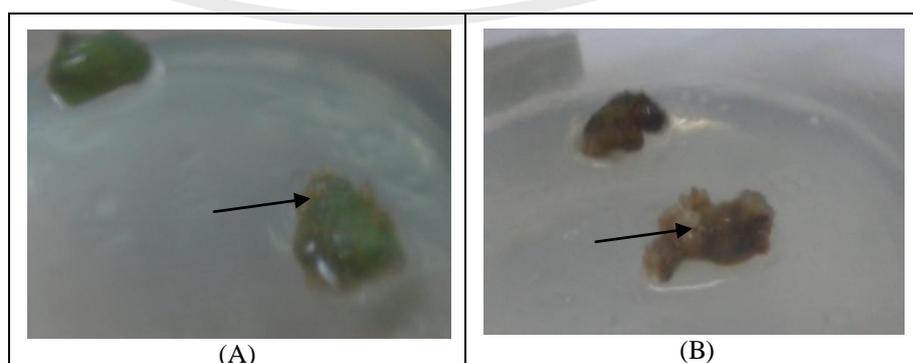
Eksplan daun pada IBA 3 mg/l menghasilkan kalus berwarna hijau (H) setelah dua minggu (Gambar 4.2 A). Warna kalus berubah menjadi hijau kekuningan (HK) pada minggu kedelapan (Gambar 4.2 B). Warna hijau disebabkan kalus mengandung klorofil, akibat interaksi ZPT yang berperan

dalam pembentukan klorofil pada kalus serta faktor lingkungan yaitu paparan cahaya lampu. George & Sherrington (1993) menyatakan, cahaya putih dapat merangsang pembentukan kalus dan organogenesis kultur jaringan tumbuhan.

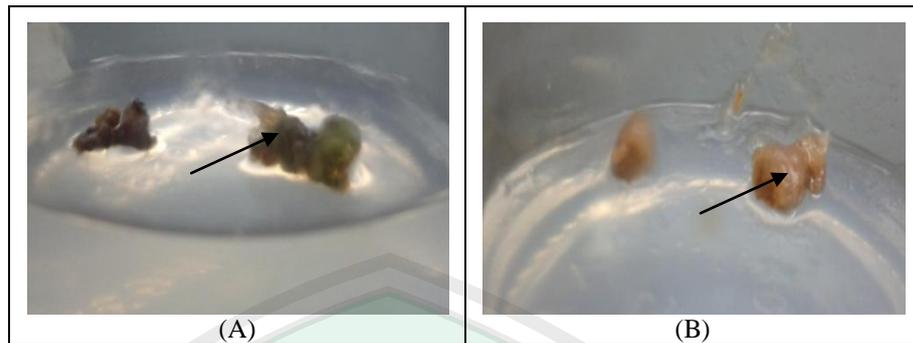


Gambar 4.2 Perubahan warna kalus Purwoceng (*Pimpinella alpine*) eksplan daun dengan konsentrasi IBA 3 mg/l pada minggu ke-2 (A) dan ke-8 (B) (tanda →: warna kalus)

Eksplan daun dalam IBA 5 mg/l menghasilkan kalus berwarna hijau kekuningan (HK) pada minggu kedua (Gambar 4.3 A) dan pada minggu kedelapan warna kalus menjadi kuning kecoklatan (KC) (Gambar 4.3 B), sedangkan eksplan pada IBA 7 mg/l menghasilkan kalus berwarna hijau kekuningan setelah dua minggu tanam (Gambar 4.4 A) dan pada pengamatan minggu keempat, keenam menjadi kuning kecoklatan dan menjadi berwarna coklat pada minggu kedelapan (Gambar 4.4 B).



Gambar 4.3 Perubahan warna kalus Purwoceng (*Pimpinella alpine*) eksplan daun dengan konsentrasi IBA 5 mg/l pada minggu ke-2 (A) dan ke-8 (B) (tanda →: warna kalus)



Gambar 4.4 Perubahan warna kalus Purwoceng (*Pimpinella alpine*) eksplan daun dengan konsentrasi IBA 7 mg/l pada minggu ke-2 (A) dan ke-8 (B) (tanda ➔: warna kalus)

Leupin (2000) menyatakan, perubahan warna kalus menjadi kehijauan disebabkan mulai terbentuk klorofil, semakin lama warna kalus menjadi hijau kekuningan atau keputihan disebabkan terjadinya proliferasi sel. Apabila kalus banyak mengandung klorofil maka proliferasi sel terjadi lambat dan hanya terjadi perkembangan sel sehingga kalus yang terbentuk lebih sedikit. Kalus berwarna kehijauan (kuning kehijauan) lebih segar dibandingkan warna kalus yang lain dan menandakan bahwa sel-sel dalam kalus tersebut masih hidup dan masih aktif membelah.

Eksplan petiol pada IBA 3 mg/l menghasilkan kalus berwarna hijau bening pada minggu kedua (Gambar 4.5 A), minggu keempat kalus tetap berwarna hijau bening. Pada pengamatan minggu kedelapan kalus petiol Purwoceng berwarna hijau kekuningan (Gambar 4.5 B). Warna tersebut menandakan bahwa kalus tumbuh dengan baik. IBA 5 mg/l menghasilkan kalus warna hijau dengan bagian tepi berwarna coklat (Gambar 4.6) akibat adanya pengaruh dari bekas perlakuan pada eksplan dan juga merupakan tahapan awal perubahan warna kalus menjadi kehijauan. Eksplan petiol pada

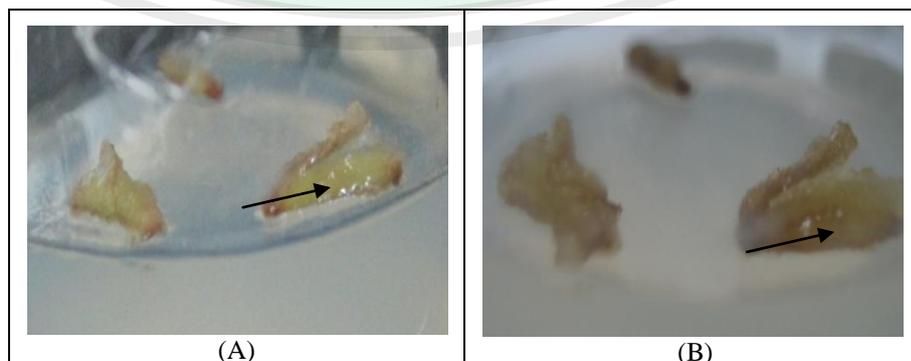
IBA 7 mg/l menghasilkan kalus hijau kekuningan setelah 2 minggu tanam (Gambar 4.7 A) sedangkan pada pengamatan minggu kedelapan kalus menjadi kuning kecoklatan (Gambar 4.7 B).



Gambar 4.5 Perubahan warna kalus Purwoceng (*Pimpinella alpine*) eksplan petiol dengan konsentrasi IBA 3 mg/l pada minggu ke-2 (A) dan ke-8 (B) (tanda →: warna kalus)



Gambar 4.6 Perubahan warna kalus Purwoceng (*Pimpinella alpine*) eksplan petiol dengan konsentrasi IBA 5 mg/l pada minggu ke-2 (A) dan ke-8 (B) (tanda →: warna kalus)



Gambar 4.7 Perubahan warna kalus Purwoceng (*Pimpinella alpine*) eksplan petiol dengan konsentrasi IBA 7 mg/l pada minggu ke-2 (A) dan ke-8 (B) (tanda →: warna kalus)

Robbiani (2010) menyatakan bahwa warna kalus mengindikasikan keberadaan klorofil dalam jaringan, semakin hijau warna kalus maka semakin banyak pula kandungan klorofilnya. Warna terang atau putih dapat mengindikasikan bahwa kondisi kalus masih cukup baik, sedangkan warna kalus yang semakin gelap (cokelat) berarti pertumbuhan kalus menurun.

Zat pengatur tumbuh IBA ini rata-rata menghasilkan kalus yang berwarna hijau dan kecoklatan sehingga jumlah kalus relatif sedikit akan tetapi kalus yang dihasilkan memiliki kualitas yang baik. Kalus yang berwarna hijau berasal dari kalus putih yang awalnya tidak mengandung kloroplas, tetapi mengandung plastid berisi butir pati yang akan tumbuh menjadi sistem membran dan akhirnya terbentuk butir-butir klorofil akibat paparan cahaya sehingga kalus lama-kelamaan menjadi berwarna hijau.

Respon tanaman terhadap intensitas cahaya berbeda tergantung dari sifat adaptif tanaman tersebut. Tanaman memiliki ambang batas terhadap intensitas cahaya yang harus diterima. Intensitas cahaya yang terlalu tinggi menyebabkan rusaknya struktur kloroplas, sehingga produktifitas tanaman menurun. Cahaya yang cukup akan menghasilkan pertumbuhan kalus optimal sehingga ruang inkubasi Purwoceng dilakukan pengaturan pencahayaan yaitu selama 16 jam lampu dinyalakan dan 8 jam lampu dimatikan.

Peristiwa pencoklatan pada kalus adalah peristiwa alamiah yang merupakan suatu proses perubahan adaptif bagian tanaman. Pencoklatan tersebut disebabkan oleh cekaman atau gangguan pada sel akibat berkurangnya nutrisi pada media sehingga kalus tidak mengalami proliferasi.

Warna yang baik dari sebuah kalus adalah hijau (hijau kekuningan) dimana dari kalus dengan warna tersebut merupakan kalus yang tumbuh dengan optimal yang akan mempengaruhi hasil produksi metabolit sekundernya.

Kalus dengan warna kehijauan atau hijau kekuningan merupakan kalus yang dapat menghasilkan produksi metabolit sekunder yang lebih tinggi dibandingkan dengan kalus yang berwarna kecoklatan seperti halnya dalam penelitian ini. Kalus yang memiliki warna hijau kekuningan menghasilkan produksi stigmasterol dan sitosterol yang lebih tinggi dibandingkan kalus yang berwarna kecoklatan. Hal tersebut seperti penjelasan Leupin (2000) yang menjelaskan kalus dengan warna hijau kekuningan merupakan kalus yang tumbuh dengan baik karena kalus masih aktif melakukan metabolisme dalam sel, selain itu Verpoorte *et al.* (1993) menyebutkan bahwa kalus yang berwarna kecoklatan menandakan terjadinya degradasi klorofil, yang artinya kalus sudah tidak aktif melakukan metabolisme sel (kalus mati). Sehingga dapat diketahui bahwasanya sel yang masih hidup memiliki warna yang lebih terang, karena kalus masih melakukan metabolisme dalam sel-selnya seperti produksi metabolit sekunder. Sedangkan kalus yang berwarna coklat menandakan pertumbuhan kalus mulai terhambat dan lama kelamaan kalus akan mengalami kematian.

Hendaryono dan Wijayani (1994) menyatakan warna kalus yang bervariasi disebabkan oleh adanya pigmentasi, pengaruh cahaya, dan bagian tanaman yang dijadikan sebagai sumber eksplan. Dian (2004) menyebutkan bahwa warna kalus dapat memperlihatkan baik tidaknya pertumbuhan kalus.

Verpoorte *et al.* (1993), terjadinya pencoklatan jaringan karena polifenol oksidase yang disintesis akibat dari oksidasi jaringan ketika terluka, selain itu warna coklat berarti terdapat proses degradasi klorofil. Hal ini sesuai dengan Santosa dan Nursandi (2002) bahwa kalus yang tidak hijau disebabkan oleh hilangnya polarisasi, sehingga terjadi proses dekomposisi klorofil.

4.1.3.2 Tekstur Kalus

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 IBA 0 mg/l tidak menghasilkan kalus. IBA 3 mg/l dengan eksplan daun membentuk kalus yang memiliki tekstur intermediate (semi remah) dan kompak. Kalus intermediate (Gambar 4.8 A1) yang terbentuk memiliki ciri-ciri berwarna kekuningan, sel tidak berkumpul dan lebih mudah dipisahkan dibandingkan kalus yang bertekstur kompak. Tekstur kalus kompak yang tumbuh pada konsentrasi IBA 3 mg/l memiliki ciri-ciri sel padat, warna lebih bening dibandingkan kalus intermediate, banyak mengandung air dan sulit dipisahkan.

Media MS dan IBA 5 mg/l dengan eksplan daun menghasilkan kalus Purwoceng dengan tekstur kompak (Gambar 4.8 B1). Kalus ini muncul dari permukaan daun dengan bentuk gumpalan padat yang mengandung air dan lebih sulit dipisahkan dibandingkan kalus bertekstur remah selain itu kalus kompak memiliki kandungan air yang cukup tinggi. Media MS dengan IBA 7

mg/l menghasilkan kalus bertekstur kompak, banyak mengandung air dan berkumpul membentuk gumpalan yang padat (Gambar 4.8 C1).

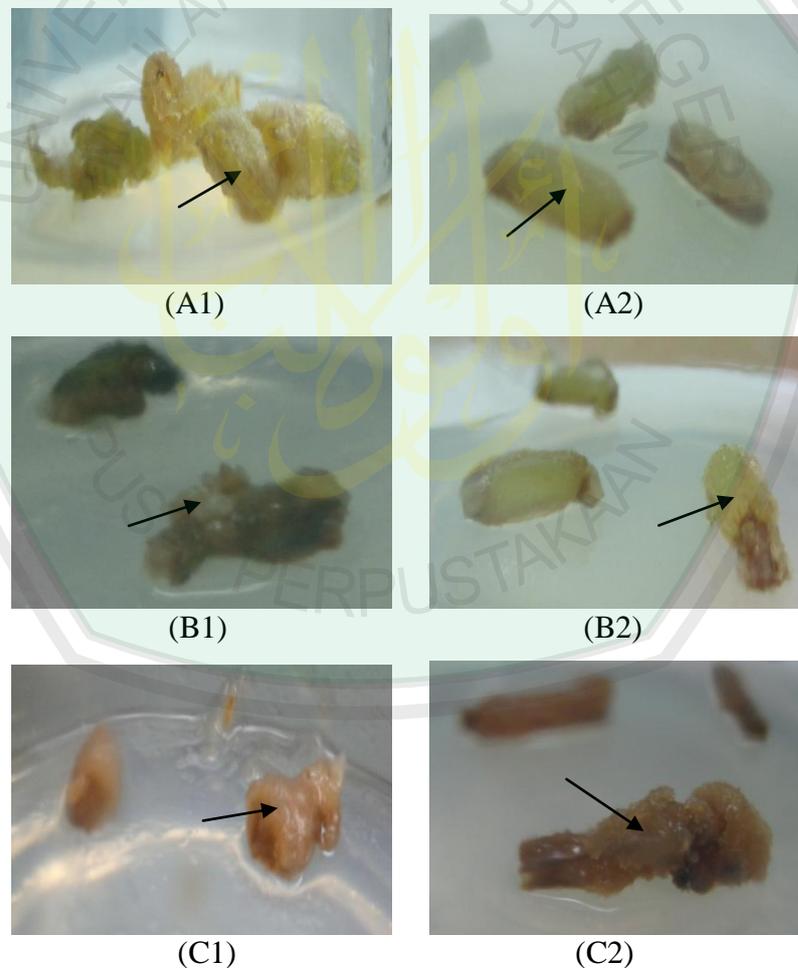
Eksplan petiol pada IBA 0 mg/l tidak menghasilkan kalus, sedangkan eksplan petiol pada IBA 3 mg/l, 5 mg/l ataupun 7 mg/l menghasilkan kalus dengan tekstur kompak (Gambar 4.8 A2, B2, C2). Pengamatan dilakukan selama 8 minggu dan tekstur kalus tidak mengalami perubahan. Kalus berupa kumpulan sel dengan jumlah banyak, padat dan banyak mengandung air. Kalus kompak memiliki struktur terorganisasi ditandai dengan nodul berwarna hijau dan baik untuk regenerasi planlet. Tekstur kalus kompak memiliki ciri-ciri antara satu sel dengan yang lain sulit dipisahkan karena sel mengumpul membentuk gumpalan yang kompak.

Kalus dengan tekstur kompak atau intermediate merupakan kalus yang dapat menghasilkan metabolit sekunder lebih tinggi dibandingkan kalus dengan tekstur remah. Hal ini terjadi karena produksi senyawa metabolit sekunder terjadi pada saat pertumbuhan kalus mencapai batas optimal (fase stasioner). Sedangkan kalus dengan tekstur remah memiliki masa proliferasi (perbanyakan dan pertumbuhan) kalus lebih panjang sehingga produksi metabolit sekunder lebih sedikit dibandingkan dengan kalus dengan tekstur kompak. Hal ini sesuai dengan penjelasan Aisyah (2007) yang menyatakan bahwa kalus akan menghasilkan senyawa metabolit sekunder ketika sel-sel kalus mengalami penurunan aktifitas pembelahan atau pertumbuhan sel.

Tabel 4.4 Tekstur kalus yang terbentuk setelah 8 minggu

No.	Eksplan	Konsentrasi IBA (mg/l)	Tekstur kalus
1.	Daun	0	-
		3	K/I
		5	K
		7	K
2.	Petiol	0	-
		3	K
		5	K
		7	K

Keterangan: K : Kompak I : Intermediate (semi remah)



Gambar 4.8 Tekstur kalus Purwoceng (*Pimpinella alpine*) pada minggu ke-8. (A1) eksplan daun dengan IBA 3 mg/l, (A2) eksplan petiol dengan IBA 3 mg/l. (B1) eksplan daun dengan IBA 5 mg/l, (B2) eksplan petiol dengan IBA 5 mg/l. (C1) eksplan daun dengan IBA 7 mg/l, (B2) eksplan petiol dengan IBA 7 mg/l. Tanda ➔: menunjukkan tekstur kalus

Kalus yang terbentuk dari eksplan daun memiliki tekstur kompak dan intermediate (semiremah) sedangkan untuk petiol, semua kalus yang terbentuk memiliki tekstur kompak. Dari hasil perbandingan tersebut dapat diketahui bahwasanya tekstur kalus dipengaruhi oleh jenis eksplan, ZPT dan komposisi media. Adanya sukrosa dalam media dapat menimbulkan tekanan turgor yang mengalir melalui pembuluh floem. Tekanan tersebut muncul akibat adanya perbedaan konsentrasi larutan, sehingga air dan zat hara (sukrosa) dari media masuk dalam sel melalui cara osmosis. Hal ini membuat dinding sel semakin kaku, sehingga kalus menjadi kompak. Sukrosa merupakan cadangan makanan yang akan diubah menjadi pati sebagai energi pada proses morfogenesis eksplan dalam membantu sel untuk membelah.

Menurut Purwianingsih (2007), struktur kalus kompak dan terjadinya perubahan warna kekuningan/kehijauan, mengindikasikan terjadi diferensiasi sel. Kalus kompak terjadi melalui proses pertumbuhan yang mengarah pada pembentukan sel yang berikatan rapat dan padat. Auksin (IBA) dapat menstimulasi pemanjangan sel dengan cara penambahan plastisitas dinding sel (longgar), sehingga air dapat masuk ke dalam dinding sel dengan cara osmosis dan sel mengalami pemanjangan. Oleh karena itu, kalus kompak mengandung banyak air karena belum mengalami lignifikasi dinding sel.

4.1.3 Berat Kalus Purwoceng

Data yang diperoleh dari hasil penimbangan berat kalus selanjutnya dianalisis dengan menggunakan Analisis Variansi (ANAVA). Berdasarkan hasil penelitian dan ANAVA diperoleh data yang menunjukkan bahwa ada

pengaruh perlakuan konsentrasi terhadap berat kalus Purwoceng karena $F_{hitung} > F_{tabel}$ 0.05, sedangkan eksplan tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap berat kalus (non signifikan). Untuk mengetahui lebih lanjut tentang pengaruh konsentrasi IBA yang diberikan, maka dilakukan uji lanjut dengan menggunakan DMRT (Duncan) 5% (tabel 4.5).

Tabel 4.5 Pengaruh Konsentrasi IBA terhadap berat kalus Purwoceng

Konsentrasi IBA (mg/l)	Berat kalus (gram)
0	0,707 a
3	0,793 b
5	0,774 b
7	0,767 b

Keterangan: 1. Angka yang didampingi oleh huruf yang sama pada kolom yang bersesuaian tidak berbeda nyata pada uji DMRT α : 0.05
2. Data ditransformasi dengan transformasi akar

Berdasarkan tabel 4.5 menunjukkan bahwa adanya zat pengatur tumbuh IBA memberikan pengaruh terhadap penambahan volume kalus dibandingkan dengan eksplan yang ditanam dalam media 0 mg/l IBA. Adanya IBA dengan konsentrasi yang berbeda dalam media tidak memberikan perberbedaan yang nyata.

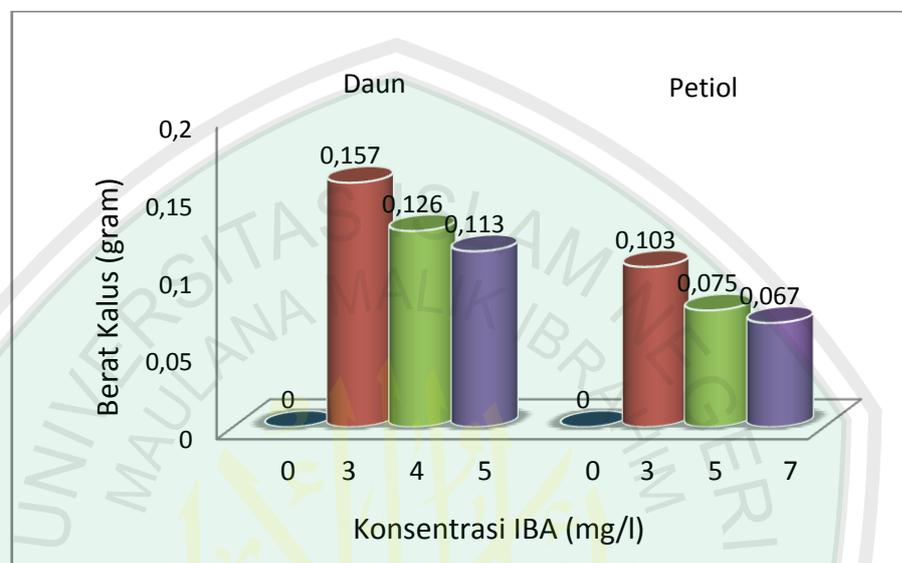
Berat kalus merupakan salah satu indikator adanya proses pertumbuhan dari eksplan. Hal ini disebabkan sel-sel kalus mengalami pembelahan sehingga massa sel meningkat. Peningkatan massa sel menyebabkan berat kalus menjadi bertambah karena jumlah sel semakin banyak. Penimbangan berat kalus daun dan petiol dilakukan pada

pengamatan minggu ke-8 setelah tanam. Eksplan daun pada IBA 3 mg/l memiliki berat rata-rata kalus 0.157 gram, IBA 5 mg/l dapat menghasilkan kalus dengan berat rata-rata yaitu 0.126 gram. IBA 7 mg/l menghasilkan kalus dengan berat 0.113 gram sedangkan eksplan yang ditanam pada IBA 0 mg/l (kontrol) tidak terbentuk kalus dengan eksplan 0 gram.

Eksplan petiol yang ditanam pada IBA 0 mg/l tidak membentuk kalus. Berat rata-rata kalus petiol yang ditanam pada media MS dengan IBA 3 mg/l setelah dilakukan penimbangan diketahui sebesar 0.103 gram. Petiol yang ditanam pada media MS dengan penambahan IBA 5 mg/l menghasilkan kalus dengan berat rata-rata 0.075 gram, sedangkan eksplan petiol pada IBA 7 mg/l menghasilkan kalus dengan berat 0.067 gram dan untuk IBA 0 mg/l tidak menghasilkan kalus sehingga memiliki berat 0 gram.

Berat kalus secara umum bertambah jika dilihat dari data berat yang meningkat diakhir pengamatan dengan adanya penambahan IBA dalam media, karena pada media kontrol atau IBA 0 mg/l tidak menghasilkan kalus dan berat eksplan tidak bertambah. Berat kalus dari eksplan daun yang tertinggi berdasarkan hasil penimbangan adalah 0.157 gram pada media MS dengan IBA 3 mg/l dan yang terendah adalah 0 gram pada IBA 0 mg/l, sedangkan eksplan petiol berat kalus tertinggi adalah 0.103 gram pada IBA 3 mg/l dan kalus terendah adalah yang ditanam pada media MS dengan IBA 0 mg/l yaitu 0 gram. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa konsentrasi IBA yang paling tepat untuk menumbuhkan kalus Purwoceng adalah 3 mg/l, karena pada konsentrasi tersebut dapat dihasilkan kalus dalam jumlah yang

paling banyak seperti tertera pada gambar 4.9. Grafik tersebut menunjukkan bahwasanya IBA 3 mg/l memiliki grafik tertinggi dibandingkan dengan konsentrasi yang lain, baik pada eksplan daun maupun petiol.



Gambar 4.9 Histogram berat kalus Purwoceng (*Pimpinella alpine*) eksplan daun dan petiol setelah 8 minggu

Eksplan yang ditanam pada IBA 7 mg/l menghasilkan kalus terendah dibandingkan dengan eksplan pada IBA 3 mg/l, hal ini diduga disebabkan oleh IBA yang digunakan memiliki konsentrasi yang tinggi. IBA biasanya digunakan dalam jumlah kecil dan dalam waktu yang singkat, antara 2-4 minggu karena merupakan auksin kuat, artinya auksin ini tidak dapat diuraikan dalam tubuh tanaman, dosis terlalu tinggi dapat menghambat pertumbuhan kalus (Hendaryono dan Wijayani, 1994). Sebab pada suatu dosis tertentu IBA dapat menyebabkan mutasi-mutasi (Suryowinoto, 1996).

Konsentrasi IBA 3 mg/l merupakan konsentrasi yang paling tepat untuk menumbuhkan kalus Purwoceng baik dari eksplan daun maupun petiol, karena konsentrasi tersebut dapat menghasilkan kalus dalam waktu tercepat

serta memiliki jumlah (berat) terbanyak. Sel-sel dari kalus Purwoceng yang tumbuh pada IBA 3 mg/l melakukan pembelahan dengan sangat cepat karena sel bertambah besar dalam waktu yang cepat dibandingkan dengan kalus pada IBA 5 mg/l dan 7 mg/l. Adanya IBA dalam media tanam dapat mempengaruhi proses metabolisme sel. Metabolisme merupakan reaksi kimia yang terjadi di dalam sel dengan melibatkan enzim, metabolisme dapat berupa reaksi penyusunan (anabolisme) dan reaksi penguraian (katabolisme). Metabolisme sel dilakukan untuk memperoleh energi, menyimpan energi, menyusun bahan makanan, merombak bahan makanan, membentuk struktur sel, merombak struktur sel, memasukkan atau mengeluarkan zat-zat, melakukan gerakan, menanggapi rangsangan dan bereproduksi (Lakitan, 1996) sehingga dengan adanya zat pengatur tumbuh ini menyebabkan kalus mengalami pertumbuhan dan penambahan berat kalus.

Allah menciptakan segala sesuatu di dunia sesuai dengan ukurannya, sebagaimana firman Allah dalam al-Qur'an surat al-Furqaan (25) ayat 2:

الَّذِي لَهُ مُلْكُ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ وَلَمْ يَتَّخِذْ وَلَدًا وَلَمْ يَكُنْ لَهُ شَرِيكٌ فِي الْمَلِكِ
وَحَلَقَ 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.” (QS. al-Furqaan/25: 2)

Q.S Furqaan ayat 2 ini memiliki arti *Dia telah menciptakan segala sesuatu, dan Dia menetapkan ukuran-ukurannya dengan serapi-rapinya.* Potongan ayat tersebut menjelaskan bahwasanya Allah menciptakan segala

sesuatu yang ada di dunia ini sesuai dengan yang dibutuhkan dan meletakkan segala sesuatu sesuai dengan tempatnya. Ayat tersebut tercermin dalam hasil penelitian ini dimana zat pengatur tumbuh IBA yang digunakan dalam media MS yang sesuai dengan takarannya (ukurannya) dapat menumbuhkan kalus dengan optimal. Hasil yang optimal dapat diperoleh apabila segala sesuatu yang digunakan sesuai dengan takarannya dan kebutuhannya. Sesuatu yang digunakan dengan berlebihan maka hasil yang diperoleh tidak akan optimal. Ukuran zat pengatur tumbuh IBA yang sesuai untuk pertumbuhan kalus Purwoceng dalam penelitian ini adalah 3 mg/l, apabila diberikan lebih dari 3 mg/l maka kalus tidak dapat tumbuh dengan optimal seperti halnya konsentrasi IBA 5 mg/l dan 7 mg/l.

4.2 Pengaruh Perbedaan Eksplan dan Konsentrasi IBA Terhadap Kadar Stigmasterol dan Sitosterol Kalus Purwoceng (*Pimpinella alpine* Molk.)

Hasil analisis variansi (ANOVA) menunjukkan bahwa terdapat pengaruh yang nyata dari jenis eksplan dan konsentrasi IBA terhadap kadar stigmasterol dan sitosterol kalus Purwoceng, karena $F_{hitung} > F_{tabel}$ dengan taraf signifikan 95%, dengan demikian hipotesis H_0 ditolak dan H_1 diterima kemudian dilanjutkan dengan uji lanjut DMRT 5%. Hal ini menunjukkan bahwa ada pengaruh jenis eksplan dan konsentrasi IBA terhadap kadar stigmasterol dan sitosterol kalus Purwoceng sebagaimana tercantum dalam tabel 4.6 dibawah ini.

Tabel 4.6 Pengaruh jenis eksplan dan konsentrasi IBA terhadap kadar stigmasterol dan sitosterol kalus Purwoceng

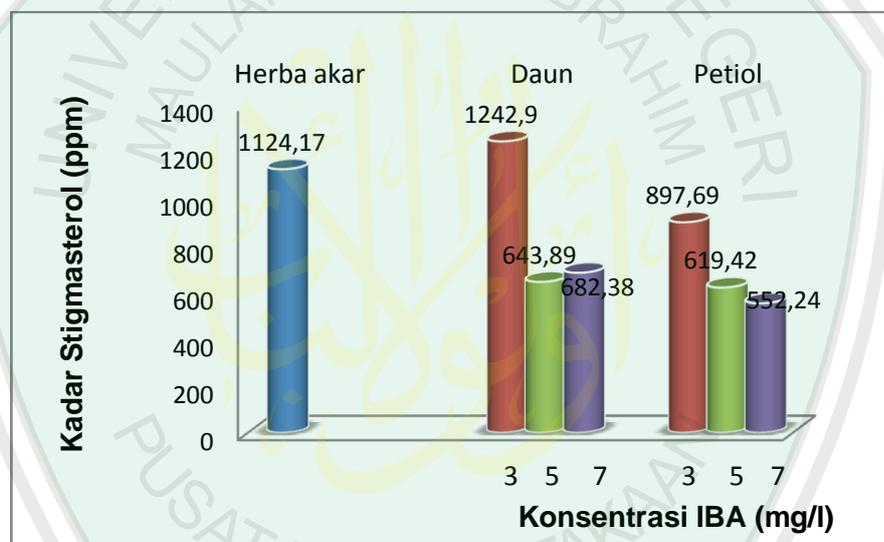
No	Eksplan	Konsentrasi IBA (mg/l)	Kadar Stigmasterol (ppm)	Kadar Sitosterol (ppm)
1.	Daun	3	1242,9 e	2079,4 d
		5	643,89 bc	1140,5 b
		7	682,38 c	1214,5 c
2.	Petiol	3	897,69 d	1165,6 b
		5	619,42 b	1225,6 c
		7	552,24 a	832,02 a
3.	Herba	-	1124,17	2002,67

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

Berdasarkan hasil uji lanjut DMRT 5% menunjukkan bahwa perbedaan jenis eksplan dan konsentrasi zat pengatur tumbuh IBA memberikan pengaruh terhadap kadar stigmasterol dan sitosterol kalus purwoceng (tabel 4.6). Adanya IBA dengan konsentrasi yang berbeda dalam media memberikan perberbedaan yang nyata.

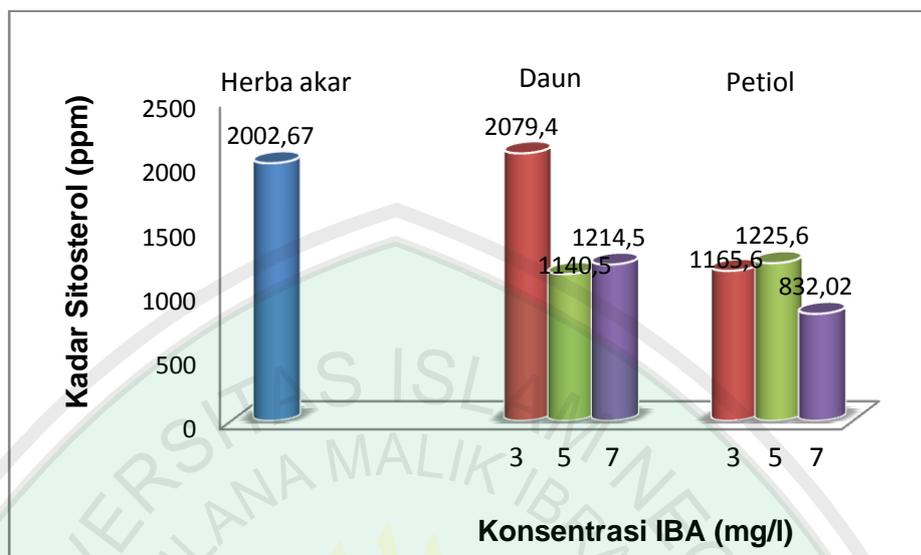
Kadar stigmasterol dan sitosterol kalus Purwoceng yang telah dianalisis dengan kromatografi kolom diketahui bahwa secara keseluruhan sitosterol memiliki kadar yang lebih tinggi daripada stigmasterol baik pada eksplan daun maupun petiol. Hasil penelitian Linsdsey dan Yeoman (1983) menyatakan, kalus bertekstur remah umumnya akan mengakumulasi senyawa metabolit sekunder dalam jumlah sedikit, dibanding kalus bertekstur kompak. Kalus yang dihasilkan dari eksplan daun maupun petiol menghasilkan kalus bertekstur kompak, sehingga dapat dipastikan senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan memiliki kadar yang tinggi.

Gambar 4.10 menjelaskan kadar stigmasterol kalus Purwoceng, dari gambar grafik tersebut dapat diketahui bahwa eksplan daun dalam konsentrasi IBA 3 mg/l menghasilkan stigmasterol yang tertinggi yaitu 1242.9 ppm sedangkan yang terendah adalah 552.25 ppm dari eksplan petiol yang ditanam dalam media dengan IBA 7 mg/l. Dari grafik tersebut dapat diketahui bahwasanya kalus dari eksplan daun memiliki kandungan stigmasterol lebih tinggi dibandingkan dengan herba akar dari lapang.



Gambar 4.10 Kadar Stigmasterol kalus Purwoceng (*Pimpinella alpine*)

Gambar 4.11 menjelaskan kadar sitosterol yang dihasilkan oleh kalus Purwoceng dalam gambar grafik tersebut dapat diketahui bahwa eksplan daun dalam konsentrasi IBA 3 mg/l mampu memproduksi kadar sitosterol yang tertinggi. Konsentrasi IBA yang semakin tinggi maka nilai dalam grafik tersebut semakin menurun seperti tertera pada grafik tersebut.



Gambar 4.11 Kadar Sitosterol kalus Purwoceng (*Pimpinella alpine*)

Kadar stigmasterol eksplan daun pada IBA 3 mg/l sebesar 1242.9 ppm sedangkan kadar sitosterol 2079,42 ppm. Uji kromatografi kalus daun Purwoceng pada IBA 5 mg/l menghasilkan stigmasterol sebesar 643.89 ppm dan sitosterol 1140.45 ppm. Kalus daun pada IBA 7 mg/l menghasilkan stigmasterol 682.38 ppm dan sitosterol 1214.49 ppm. Media 0 mg/l IBA tidak menghasilkan kalus sehingga tidak dilakukan uji kromatografi kolom.

Hasil uji senyawa stigmasterol dan sitosterol dengan kromatografi kolom dari kalus daun pada IBA 0 mg/l, 3 mg/l, 5 mg/l dan 7 mg/l yang menghasilkan kandungan stigmasterol dan sitosterol tertinggi adalah pada IBA 3 mg/l, sedangkan untuk sitosterol terendah adalah IBA 5 mg/l. IBA 3 mg/l menghasilkan kadar stigmasterol dan sitosterol tertinggi disebabkan eksplan daun menghasilkan pertumbuhan terbaik yaitu dari persentase terbentuknya kalus, morfologi kalus maupun berat kalus.

Eksplan kedua sebagai pembanding kadar stigmasterol dan sitosterol daun yaitu petiol (tangkai daun) berasal dari ibu tangkai daun yang masih muda. Kadar stigmasterol kalus petiol pada IBA 3 mg/l menghasilkan stigmasterol sebesar 897.69 ppm sedangkan kadar sitosterol 1165.64 ppm. Kalus petiol pada IBA 5 mg/l menghasilkan stigmasterol sebesar 619.41 ppm sedangkan sitosterol sebesar 1225.62 ppm dan untuk kalus petiol pada IBA 7 mg/l menghasilkan stigmasterol 552.25 ppm sedangkan sitosterol sebesar 832.03 ppm. petiol pada IBA 0 mg/l (kontrol) tidak dilakukan uji metabolit sekunder karena eksplan tidak membentuk kalus.

Hasil analisis kadar stigmasterol dan sitosterol dari eksplan kalus petiol pada IBA 0 mg/l, 3 mg/l, 5 mg/l dan 7 mg/l dapat diketahui bahwa kadar stigmasterol yang tertinggi adalah pada IBA 3 mg/l sedangkan untuk kadar sitosterol yang tertinggi adalah pada IBA 5 mg/l. Dari analisis kalus petiol tersebut dapat diketahui bahwasanya rata-rata kadar sitosterol lebih tinggi dari pada stigmasterol.

Kadar stigmasterol dan sitosterol tertinggi dihasilkan pada IBA 3 mg/l yang memiliki tekstur kalus kompak dengan warna hijau atau hijau kekuningan. Konsentrasi IBA 3 mg/l dapat menghasilkan kadar metabolit sekunder (stigmasterol dan sitosterol) yang tertinggi karena dari konsentrasi zat pengatur tumbuh tersebut dapat menghasilkan pertumbuhan kalus yang optimal. Tekstur kalus kompak menghasilkan kadar metabolit sekunder tertinggi karena produksi metabolit sekunder terjadi pada saat pertumbuhan mencapai batas optimal (fase stasioner) atau ketika kalus mengalami

penurunan aktifitas proliferasi sel. Tekstur kalus kompak memiliki aktifitas proliferasi sel lebih rendah dibandingkan kalus remah sehingga kalus dapat menghasilkan kadar metabolit sekunder lebih tinggi. Warna kalus kehijauan atau hijau kekuningan menghasilkan kadar metabolit sekunder tertinggi karena kalus dengan warna tersebut merupakan kalus yang tumbuh dengan baik dan masih aktif melakukan proses metabolisme dalam sel.

Uji kadar stigmasterol dan sitosterol yang tertinggi adalah dari eksplan daun dengan rata-rata sebesar 1242,9 ppm dan 2079,42 ppm sedangkan untuk petiol adalah 897.69 ppm dan 1225.62 ppm. Hasil tersebut menyatakan bahwa kadar metabolit sekunder yang dihasilkan dari eksplan daun lebih tinggi dari pada eksplan petiol, hal ini terjadi karena daun merupakan organ tanaman yang memiliki fungsi sebagai tempat fotosintesis dan proses metabolisme lainnya. Hasil tersebut sesuai dengan penjelasan Darwati (2007) yang menyatakan bahwa kadar metabolit sekunder yang dihasilkan dari eksplan daun lebih tinggi dari pada eksplan petiol.

Uji metabolit sekunder dengan kromatografi kolom juga dilakukan pada herba akar Purwoceng (tanaman dari lapang) untuk mengetahui kadar stigmasterol dan sitosterol. Hasil uji diketahui bahwasanya herba akar tanaman Purwoceng menghasilkan kadar stigmasterol sebesar 1124.17 ppm dan sitosterol 2002.67 ppm. Dari hasil tersebut dapat diketahui bahwa kadar stigmasterol dan sitosterol pada herba lebih rendah dibandingkan dengan hasil dari kalus Purwoceng (ditanam secara *in vitro*). Kalus Purwoceng dapat menghasilkan stigmasterol 1242.9 ppm dan sitosterol 2079.42 ppm.

Hasil penelitian Darwati (2007) menunjukkan kandungan sitosterol pada perlakuan daun dengan 2,4-D berkisar antara 7-10 ppm, dan untuk eksplan petiol memberikan hasil lebih tinggi yaitu 32,86 ppm, sedangkan herba dari tanaman asal lapang yang berumur 9 bulan tidak ada kandungan sitosterolnya, dan untuk kandungan stigmasterol dari kalus eksplan daun yang dikombinasikan dengan 2,4-D menghasilkan stigmasterol 0,01-0,025 ppm dan untuk petiol 0,0232; 0,04-0,05 ppm, sedangkan hasil herba (berumur 9 bulan) asal lapang menghasilkan stigmasterol yang tinggi yaitu $\pm 0,0510$ ppm. Hasil penelitian Lailatusifah (2011), menyatakan kandungan fitosterol yang berasal dari tanaman Purwoceng generasi M3 untuk stigmasterol rata-rata 0.73% sedangkan sitosterol 0.40%.

Salah satu faktor yang mempengaruhi produksi metabolit sekunder pada kultur kalus adalah kandungan media dan ZPT. Media yang sesuai akan menghasilkan pertumbuhan kalus dengan optimal akan tetapi lama-lama nutrisi media akan berkurang dan habis sehingga kalus dengan sendirinya akan menghasilkan senyawa metabolit sekunder untuk mempertahankan hidupnya, selain itu adanya IBA merupakan faktor yang memicu kadar metabolit sekunder ditandai perubahan warna kalus (kuning kehijauan).

Proses fotosintesis tidak lepas dari peran cahaya matahari. Respon tanaman terhadap intensitas cahaya yang berbeda tergantung dari sifat adaptif tanaman. Respon terhadap intensitas cahaya tinggi dapat menguntungkan atau merugikan. Hal ini karena tanaman memiliki ambang batas terhadap

intensitas cahaya yang diterima. Intensitas cahaya yang tinggi menyebabkan rusaknya struktur kloroplas menyebabkan produktifitas tanaman menurun.

Zat pengatur tumbuh secara tidak langsung mempengaruhi metabolit sekunder pada eksplan. Zat pengatur tumbuh (hormon auksin) ini mempengaruhi proses metabolit primer yaitu karbohidrat sehingga dapat meningkatkan produksi metabolit. Disamping digunakan untuk proses metabolisme tanaman, metabolit primer juga digunakan untuk menyusun metabolit sekunder yang mendukung proses adaptasi dan proteksi tanaman. Selain zat pengatur tumbuh, adanya sukrosa juga berperan dalam proses respirasi agar pertumbuhan tanaman dapat berjalan optimal (Salisbury, 1995)

Roostika (2006) menyatakan bahwa jaringan yang mengalami cekaman akan mengalami pencoklatan dan hambatan pertumbuhan, dan pada sel-sel yang mengalami cekaman terjadi peningkatan akumulasi metabolit sekunder tertentu. Fitriani (2003) menambahkan bahwa cekaman atau gangguan yang terjadi pada sel tanaman tersebut diakibatkan karena berkurangnya nutrisi yang ada dalam media, sebab nutrisi yang tersedia tidak hanya digunakan untuk pertumbuhan kalus tetapi juga untuk kepentingan lain seperti sintesis metabolit sekunder.