

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Morfologi dan Taksonomi Purwoceng

Purwoceng (*Pimpinella pruatjan*) tumbuh pada daerah dataran tinggi dan termasuk salah satu tanaman herbal. Tanaman ini (Gambar 1) adalah tanaman terna, membentuk rosset, tajuk membentuk bulatan yang menutupi permukaan tanah dengan diameter kurang lebih 3.645 cm (Rahardjo dkk., 2006), Deskripsi tanaman purwoceng lebih detail dapat dilihat pada Gambar 1. Bunga terbentuk pada umur 5 – 6 bulan setelah tanam. Jumlah biji yang dihasilkan dari setiap tandan bunga adalah 8 – 15 biji (Rahardjo dkk., 2006). Menurut Fathonah (2008), Kedudukan taksonomi tanaman purwoceng adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Plantarum
Divisio	: Spermatophyta
Sub divisio	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledoneae
Familia	: Umbelliflorae
Bangsa/ordo	: Umbelliferae
Genus	: Pimpinella
Spesies	: <i>P. alpina</i> , Molk. / <i>Pimpinella pruatjan</i> , Molk.



Gambar 1. Tanaman Purwoceng

Daun purwoceng berbentuk seperti jantung, bersifat majemuk dan tidak memiliki anak daun penumpu dengan panjang kurang lebih 3 cm dan lebar 2,5 cm. Tepi daun bergerigi dengan ujung daun tumpul, serta pangkal

daun bertoreh. Panjang tangkai daun kurang lebih 5 cm berwarna kecoklatan. Pertulangan daun menyirip dan berwarna coklat kehijauan. Tangkai silindris dengan panjang kurang lebih 2 cm (Fathonah, 2008).

B. Kandungan Kimia Purwoceng

Akar purwoceng mengandung alkaloid, triterpenoid, flavonoid, sphondin, isobergapten, bergapten, furanokumarin, kumarin, saponin, sterol, alkaloid, dan beberapa macam senyawa gula (oligosakarida), stigmasterol, marmesin, 4-hidroksi kumarin, umbeliferon, dan psoralen (Darwati dan Roostika, 2006).

Menurut Ma'mun, dkk. (2006), hasil uji fitokimia ekstrak simplisia daun purwoceng menunjukkan bahwa simplisia maupun ekstrak mengandung alkaloid, saponin, tanin, glikosida, triterpenoid-steroid, flavonoid dan fenolik. Manfaat purwoceng sebagai aprodisiak dihasilkan oleh senyawa steroid, atsiri, furanokumarin, dan vitamin, yang terdapat pada pucuk maupun akar. Senyawa sitosterol, stigmasterol, dan stigmasta-7, 25 dien-3-ol merupakan kelompok steroid. Steroid memiliki khasiat dalam sintesis hormon testoteron pada manusia. Komponen kimia tersebut yang menjadikan purwoceng dimanfaatkan untuk meningkatkan vitalitas dan kesuburan pria (Balittro, 2014).

C. Kultur *In Vitro*

Kultur *in vitro* adalah teknik mengisolasi sel, jaringan atau organ tanaman dan dikulturkan pada medium khusus pada kondisi lingkungan yang aseptis dan terkendali hingga tanaman utuh kembali terbentuk (Basri, 2004).

Kultur *in vitro* dapat digunakan untuk memproduksi bibit dalam jumlah banyak dengan waktu relatif singkat, bibit yang dihasilkan seragam dan bebas patogen (Wattimena, 1988).

Suatu metode yang dapat digunakan sebagai alternatif yang bertujuan untuk mengoptimalkan produksi metabolit sekunder adalah kultur *in vitro* (Siregar dkk., 2006). Fungsi utama dari kultur *in vitro*, yaitu memperbanyak tanaman secara cepat dan seragam serta identik induknya. Fungsi kedua kultur ini adalah untuk menghasilkan bibit yang unggul (Mattjik, 2005). Faktor-faktor seperti pemilihan eksplan, kecocokan medium yang dipakai, kondisi yang aseptis sangat berpengaruh terhadap keberhasilan dari kultur *in vitro*. Pemilihan bagian tanaman yang akan dikultur lebih baik yang masih muda dan mudah tumbuh yaitu jaringan meristem (Hendaryono dan Wijayani, 1994).

Menurut Sukmadjaja dan Mariska (2003), Kelebihan dari kultur *in vitro* dibandingkan teknik konvensional diantaranya:

- a. Mudah dalam perbanyak tanaman
- b. Lingkungan tumbuh terkendali
- c. Tidak merusak pohon induk karena bahan yang digunakan sedikit
- d. Tanaman bebas dari penyakit
- e. Tidak memerlukan ruang yang luas untuk menghasilkan tanaman dalam jumlah banyak.

Menurut Hendaryono dan Wijayanti (1994), Jaringan meristem merupakan jaringan muda yang terdiri dari sel-sel yang aktif membelah,

memiliki dinding sel tipis, plasmanya penuh dan vakuola berukuran kecil. Salah satu bagian jaringan meristem pada tanaman terdapat pada bagian tunas.

Faktor-faktor yang berpengaruh terhadap proses inisiasi, proliferasi, dan sintesis metabolit sekunder pada kultur kalus adalah genotipe tanaman, komposisi medium serta faktor cahaya dan suhu (Siregar dkk., 2010). Biomassa kalus yang terinduksi dari kultur kalus dapat dibedakan dari segi tekstur, warna, dan kuantitas. Adanya perbedaan dikarenakan eksplan berasal dari induk dan bagian yang berbeda, diambil pada waktu yang berbeda, serta jenis dan konsentrasi zat pengatur tumbuh yang dipakai juga dapat mempengaruhi biomassa kalus yang dihasilkan (George dan Sherrington, 1984).

D. Kultur Kalus

Tahapan dari metode kultur jaringan terdiri dari beberapa tahapan, salah satunya adalah inisiasi kalus. Kalus dihasilkan tumbuhan dalam kondisi *stress* seperti ketika luka atau diinfeksi patogen. Kalus dalam biologi tumbuhan mengacu pada pertumbuhan massa sel dan akumulasi kalosa yang berhubungan dengan pelukaan. Istilah kalus digunakan lebih luas untuk mengacu masa sel yang terdiorganisasi. Kalus dapat dihasilkan dari sel terdiferensiasi. Banyak sel kalus bersifat totipoten, mampu beregenerasi menjadi tanaman utuh (Ikeuchi dkk., 2013).

Bentuk kalus dapat dikelompokkan berdasarkan tekstur dan sifat fisik. Kalus dibedakan menjadi kalus kompak dan kalus remah (*friable*) berdasarkan

teksturnya. Kalus remah cocok digunakan dalam kultur suspensi. Komposisi kimia dapat berbeda antara kalus friable dan kalus kompak (Darwati, 2007).

Batang, daun, akar, tumbuhan biji, dan bagian lainnya pada suatu spesies tanaman dapat digunakan untuk menginduksi jaringan kalus. Akan tetapi, produksi kalus yang sukses bergantung dari spesies tumbuhan dan kondisi yang tersedia. Tumbuhan dikotil lebih mudah untuk induksi jaringan kalus dibandingkan tumbuhan monokotil, sebagaimana pertumbuhan kalus tumbuhan berkayu secara umum lambat. Pada kultur, kalus dapat diperoleh secara tidak pasti dengan menyediakan sub-kultur kalus pada medium segar (Giri dan Giri, 2007).

Pada kondisi tertentu, sel kalus juga mengalami embriogenesis somatik, proses di mana embrio dibentuk dari sel somatik dewasa. Oleh karena itu, beberapa bentuk kalus diperkirakan melibatkan diferensiasi sel. Tetapi juga diketahui bahwa kalus beragam dan dapat diklasifikasi ke dalam beberapa kelompok berdasar karakter makroskopisnya. Kalus yang tidak menampilkan regenerasi organ dibedakan menjadi kalus friabel/meremah dan kompak/padat. Kalus yang menunjukkan beberapa derajat regenerasi organ dibedakan menjadi kalus akar, tunas, atau embrionik, bergantung organ yang dibentuknya (Ikeuchi dkk., 2013).

Senyawa metabolit sekunder dapat diisolasi dari kalus atau sel. Kandungan senyawa metabolit sekunder dapat ditingkatkan dengan cara pemilihan tanaman atau jaringan, pertumbuhan tanaman, pemakaian prekursor dan zat pengatur tumbuh, serta pemakaian senyawa pemacu mutasi baik secara

fisik maupun kimia dan juga faktor lingkungan. Senyawa metabolit sekunder dapat ditingkatkan pembentukannya dengan menggunakan hormon 2,4-D, NAA dan pengkombinasian dengan sitokinin. Kombinasi kedua hormon ini dapat merangsang pembelahan sel dan juga mempengaruhi kandungan senyawa sekunder (Kristina dkk., 2007).

E. Subkultur

Subkultur adalah upaya untuk memindahkan tanaman dari medium yang lama dengan medium yang baru. Hal ini diharapkan kebutuhan nutrisi untuk pertumbuhan kalus dapat terus terpenuhi. Subkultur dilakukan karena pertumbuhan tanaman berkurang, kekurangan nutrisidan media mengering (Kofranek, 1980).

Tingkat sterilitasnya eksplan, media dan lingkungan, serta kesesuaian media dan konsentrasi zat pengatur tumbuh menjadi faktor penting dalam keberhasilan subkultur. Jika kondisi eksplan, media dan lingkungan sudah aseptis, maka eksplan dapat tumbuh optimal dengan terbentuknya tunas, daun serta akar dari eksplan. Selain itu, jika medium dan konsentrasi zat pengatur tumbuh yang dipakai tidak cocok maka eksplan tidak akan tumbuh walaupun kondisinya steril (Mirsadiq, 2013).

Subkultur kalus merupakan perbanyakan kalus yang dilakukan dengan memindahkan massa kalus ke dalam media baru pada periode tertentu (Gangga dkk., 2007). Kalus dibedakan menjadi dua berdasarkan bentuk kalus yaitu kalus friable dan non-friable. Kalus yang terbentuk dari sekumpulan sel yang

mudah terlepas disebut kalus remah, sedangkan kalus non-*friable* (kompak) terdiri dari sekumpulan sel yang padat (Syahid dan Natalini, 2007).

Tahap sterilisasi merupakan faktor utama keberhasilan perbanyakan tanaman secara *in vitro*. Sterilisasi sulit dilakukan pada tanaman memiliki kontaminan pada bagian dalam dari jaringan tanaman. Perendam bahan tanaman dalam larutan kimia sistemik pada konsentrasi dan waktu perendaman tertentu, baik dengan menggunakan satu macam atau macam-macam sterilan merupakan cara setrilisasi yang umum digunakan. Senyawa sterilan yang umum dipakai untuk sterilisasi adalah alkohol, NaOCl, CaOCl, HgCl₂, dan H₂O₂ (Sukmadjaja dan Mariska, 2003). Tabel 1 menunjukkan bahan, konsentrasi, dan waktu yang diperlukan untuk sterilisasi bahan tanaman secara umum.

Tabel 1. Bahan Sterilan, Konsentrasi, dan Waktu Sterilisasi (Sumber: Sukmadjaja dan Mariska, 2003)

Sterilan	Konsentrasi (%)	Waktu (menit)
Alkohol	70-95	0,5-2
NaOCl	0,5-5	5-30
CaOCl (kaporit)	9-10	5-30
HgCl ₂ (sublimat)	0,1-1	2-10
H ₂ O ₂	3-12	5-15

Keterangan: Sterilan NaOCl biasanya digunakan bahan pemutih pakaian komersial yang mengandung 5% NaOCl sehingga konsentrasi larutan yang digunakan 10-30% v/v

Kontaminasi dalam *in vitro* ada dua tipe yaitu kontaminasi akibat bakteri dan cendawan. Kontaminasi oleh bakteri memiliki ciri dengan munculnya selaput bening pada media yang akan berubah menjadi putih kekuningan. Kontaminasi oleh cendawan dicirikan dengan tumbuhnya spora

pada medium yang menyebar ke sekeliling medium serta eksplan yang telah ditanam (Hidayat, 2008).

F. Eksplan

Penggunaan jaringan tanaman yang masih muda sebagai eksplan bertujuan karena jaringan muda mudah tumbuh dan beregenerasi. Dinding sel yang sederhana pada jaringan muda mudah untuk dimodifikasi. Menurut Kuswandi (2013), terdapat pengaruh dari bahan / eksplan yang digunakan dalam keberhasilan kultur *in vitro*, diantaranya adalah :

1. Umur tanaman yang berpengaruh terhadap persediaan air, nutrisi dan cahaya untuk tanaman tersebut.
2. Kemampuan sel-sel di dalam jaringan untuk membelah dan berdiferensiasi.
3. Kesehatan dari tanaman induk.
4. Bagian tanaman yang lebih tinggi akan lebih sulit untuk membentuk akar jika dipakai sebagai eksplan dibandingkan dengan menggunakan eksplan yang berasal dari bagian dekat dengan akar, peristiwa ini disebut dengan istilah *topophysis*.
5. Ukuran eksplan. Struktur yang lebih besar mempengaruhi kemampuan eksplan untuk pembentukan tunas atau akar yang baru karena memiliki cadangan nutrisi yang lebih banyak dan hormon endogen untuk mendukung pertumbuhan eksplan *in vitro*.

Menurut Gunawan (1987), daya tahan dari eksplan akan berkurang pada ukuran eksplan yang terlalu kecil. Sedangkan, ukuran eksplan yang terlalu besar akan sulit dalam proses sterilisasi. Sukmadjaja dan Mariska

(2003) menyatakan bahwa ukuran eksplan yang dapat digunakan dalam teknik kultur jaringan bervariasi dari ukuran mikroskopik ($\pm 0,1$ mm) hingga 5 cm.

6. Letak eksplan pada media

Peletakan eksplan pada media dengan posisi bagian bawah eksplan menempel pada media (posisi polar) atau diposisikan terbalik bagian bawah menjadi di atas (posisi apolar).

G. Medium Kultur *in vitro*

Komponen utama dalam medium kultur *in vitro* antara lain nutrisi anorganik, nutrisi organik, sumber karbon, zpt, dan agen pematid media tanam. Makronutrien merupakan unsur penting dan diperlukan dalam jumlah banyak oleh tumbuhan terdiri dari unsur utama berupa nitrogen (N), kalsium (Ca), kalium (K), fosfor (P), sulfur (S), dan magnesium (Mg) (Radzan, 2003). Mikronutrien merupakan unsur yang hanya diperlukan dalam jumlah sedikit oleh tumbuhan tetapi keberadaannya penting untuk tumbuhan seperti besi (Fe), klorin (Cl), mangan (Mn), seng (Zn), nikel (Ni) boron (B), tembaga (Cu), molibdat (Mo), alumunium (Al), kobalt (Co), iodin (I), dan natrium (Na) (Radzan, 2003).

Sutarni (1989) menyatakan bahwa, unsur-unsur yang terkandung pada medium penting bagi pertumbuhan tanaman atau jaringan tanaman. Fungsi dari setiap unsur tersebut yaitu:

1. Nitrogen (N), berfungsi memacu pertumbuhan tanaman dan berperan dalam pembentukan klorofil, asam amino, lemak, enzim, dan persenyawaan lain.
2. Fosfor (P), berfungsi untuk pembentukan karbohidrat dan pertumbuhan benih, pembungaan, dan pemasakan buah dan biji.
3. Kalium (K), berfungsi untuk memperkuat tanaman karena dapat menguatkan serabut-serabut akar, pembentukan misel dalam dinding sel.
4. Sulfur (S), digunakan dalam pembentuk protein seperti asam amino dan vitamin B1 serta pembentukan bintil akar dan pertumbuhan tunas baru.
5. Kalsium (Ca), berfungsi untuk merangsang pembentukan bulu-bulu akar, mengeraskan batang dan merangsang pembentukan biji.
6. Magnesium (Mg), berfungsi untuk pembentukan klorofil, meningkatkan kandungan fosfat dalam tanaman yang berfungsi sebagai bahan untuk pembentukan sejumlah protein, lemak, dan minyak.
7. Besi (Fe), berfungsi sebagai penyangga kestabilan pH media dan respirasi serta pembentukan hijau daun.
8. Sukrosa, sebagai sumber energi yang dibutuhkan dalam induksi kalus. Sukrosa dengan kadar 2%-5% berfungsi sebagai sumber energi sementara sukrosa dengan kadar lebih dari 3% menyebabkan terjadinya penebalan dinding sel.
9. Mio-inositol yang diberikan bersama dengan auksin, kinetin, dan vitamin akan mendorong pertumbuhan jaringan kalus.

10. Vitamin dipakai dalam medium kultur *in vitro* adalah tiamin, piridoksin, dan asam nikotinat. Tiamin membantu dalam pembelahan sel pada meristem akar dan berfungsi sebagai koenzim dalam reaksi yang menghasilkan energi. Asam nikotinat berperan dalam reaksi-reaksi enzimatik.

Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) merupakan senyawa bukan hara yang berfungsi mendukung, menghambat, mengubah proses fisiologi tumbuhan jika dalam jumlah sedikit. ZPT memiliki fungsi untuk memacu pertumbuhan morfogenesis dalam kultur *in vitro*. Penggunaan ZPT dalam konsentrasi rendah dapat merangsang dan memacu proses pertumbuhan tanaman, dan sebaliknya konsentrasi tinggi dapat menghambat pertumbuhan atau mematikan tanaman (Nisak, dkk., 2012).

Hormon merupakan faktor yang memacu perkembangan dan pertumbuhan pada tumbuhan. Hormon adalah senyawa organik yang dapat menghasilkan respons tertentu pada tumbuhan. Ada berbagai macam hormon pada tumbuhan. Lima diantaranya penting bagi tumbuhan yaitu gas etilen, asam absisat, sitokinin, giberelin, dan auksin. Selain hormon yang berasal dari dalam tubuh tumbuhan, tumbuhan juga membutuhkan hormon sintesis yang ditambahkan dari luar tubuh tumbuhan (Hendaryono dan Wijayani, 1994).

ZPT dalam kultur *in vitro* berperan dalam mengontrol organogenesis dan morfogenesis untuk pembentukan tunas dan akar serta pembentukan kalus. ZPT yang umum dipakai dalam kultur *in vitro* adalah auksin dan sitokinin. ZPT yang termasuk dalam kelompok sitokinin adalah kinetin, BA (benzil

adenin), 2-*Ip* (dimetil alil amino purin), dan zeatin. Sedangkan zpt yang termasuk dalam kelompok auksin adalah NAA (*naphtalene acetic acid*), 2,4-D (*2,4-dichlorophenoxy acetic acid*), IAA (*indole acetic acid*), IBA (*indole butiric acid*), dan picloram (Lestari, 2011).

H. Medium Driver dan Kuniyuki Walnut (DKW)

Tabel 2. Komposisi media DKW

Komponen	(mg/liter)
Ammonium nitrat (NH_4NO_3)	1416
Calcium chloride ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	149
Calcium nitrate	1968
Magnesium sulfate ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	740
Potassium sulfate	1559
Boric acid (H_3BO_3)	4,8
Nickel sulfate	0,005
Cupric sulfate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0,25
Manganese sulfate ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	33,5
Potassium iodide (KI)	0,39
Sodium molybdate ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0,39
Zinc nitrate	17
Na ₂ EDTA	45,4
Ferrous sulfate ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	33,8
Inositol	100
Thiamine HCl	2
Nicotinic acid	1
Sucrose	30000
Glycine	2
Agar	2400

Sumber : Driver, 1986

Sebuah medium awalnya dikembangkan untuk walnut disebut DKW (Driver dan Kuniyuki Walnut) mengandung ion amonium (17,7 mM). Selain itu, DKW adalah satu-satunya media yang berisi Ni^+ , meskipun pada

konsentrasi sangat rendah, dan mengandung hampir dua kali konsentrasi Zn^{++} dari medium MS dan QL. DKW juga lebih unggul dari medium QL dan MS untuk regenerasi adventif pada eksplan daun (Driver, 1986).

I. Nitrogen

Kemampuan jaringan membentuk kalus dan laju pertumbuhan kalus tergantung pada medium, zat pengatur tumbuh dan beberapa faktor lingkungan lainnya. Nitrogen merupakan faktor utama dalam memacu morfogenesis secara *in vitro* (Purnamaningsih, 2006). Nitrogen memiliki peran penting dalam pertumbuhan tanaman dan perkembangan karena memiliki efek langsung pada tingkat totipotensi pertumbuhan sel dan diferensiasi (Ikram-ul-Haq and Zafar, 2004)

Nitrogen merupakan unsur yang sangat penting dalam pertumbuhan jaringan tanaman. Nitrogen merupakan komponen protein, asam nukleat dan beberapa substansi penting lainnya yang dibutuhkan untuk pembentukan protoplasma dan berfungsi memperbaiki pertumbuhan vegetatif (Widiastoety dan kartikaningrum, 2003)

Amonium nitrat merupakan salah satu sumber nitrogen bagi tumbuhan. Apabila tanaman kekurangan nitrogen maka pertumbuhannya akan terhambat dan jaringan tanaman akan mati. Protein dan karbohidrat merupakan unit penyusun sel. Karbohidrat sebagian akan bergabung dengan asam lemak dan sebagian akan bergabung dengan asam amino yang terbentuk dari ammonium membentuk membrane sel (George dan Sherrington, 1984)

Unsur nitrogen pada medium dipenuhi dalam bentuk nitrat (NO_3^-) dan amonium (NH_4^+). Konsentrasi nitrat biasanya antara 25–40 mM dan konsentrasi amonium antara 2–20 mM (Gamborg & Shyluk 1981). Apabila dalam medium konsentrasi NH_4^+ terlalu tinggi, pH medium akan turun dan medium agar menjadi cair (Pierik, 1997).

J. Sukrosa

Karbohidrat mempunyai dua fungsi utama dalam kultur *in vitro* yaitu sebagai sumber energi dan untuk keseimbangan tekanan osmosis dalam medium. Sukrosa merupakan sumber energi yang paling sesuai untuk kultur *in vitro*. Kadar sukrosa 2 – 4 % (w/v) dapat memberikan pertumbuhan kalus yang optimal (George dan Sherrington, 1984).

Menurut George dan Sherrington (1984) sumber karbohidrat yang paling baik yaitu dalam bentuk sukrosa, glukosa, maltosa dan rafinosa. Menurut yusnita (2003), salah satu komponen penting yang harus ada dalam media kultur adalah gula. Gula yang paling sering digunakan adalah sukrosa. Sukrosa dalam media kultur berfungsi sebagai sumber energi, karena umumnya bagian tanaman atau eksplan yang dikulturkan tidak autotrof dan mempunyai laju fotosintesis sangat rendah.

Menurut Prawiranata dkk. (1994), sukrosa dan pati merupakan bentuk karbohidrat cadangan yang penting dalam sel tumbuhan. Selain itu sukrosa merupakan bentuk senyawa organik utama yang ditransportasikan ke dalam sel tumbuhan. Senyawa organik tersebut berperan dalam menghasilkan energi dalam proses respirasi dan sebagai bahan pembentuk sel baru.

K. Hipotesis

Induksi kalus purwoceng yang optimal menggunakan medium dengan kadar sukrosa 30 g/l dan kadar nitrogen 1,416 g/l.

