

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Tanaman Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz and Pav.)

Tumbuhan sirih dikenal sebagai antiseptik sejak 600 SM. Sirih termasuk family *Piperaceae* yang merambat dan bersandar di batang pohon lain (Duryatmo, 2005). Salah satu jenis sirih adalah sirih merah. Menurut Duryatmo (2005), sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz and Pav.) merupakan jenis sirih yang merambat dan banyak tumbuh di daerah tropis khususnya Indonesia. Sirih jenis ini sebelumnya dikenal sebagai tanaman hias, kemudian berubah menjadi tanaman obat sejak diperkenalkan oleh produsen obat di Bulnyaherjo. Tanaman Sirih Merah dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Tanaman Sirih Merah
Keterangan: a = daun, b = batang
(Sumber: Dokumentasi Pribadi, 2013).

Tanaman sirih merah ini merupakan tanaman merambat, yang tumbuh hingga mencapai ketinggian 10 kaki atau lebih, mudah tumbuh di daerah tropis (khususnya daerah lembab), dan perkembangbiakannya menggunakan stek. Permukaan atas daun ini berwarna hijau gelap berpadu dengan tulang daun merah kepekatan, sedangkan permukaan bawah daun berwarna merah keunguan (Duryatmo 2005). Oleh karena itu, menurut Cronquist (1981), Kedudukan taksonomi tanaman Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz and Pav.) adalah sebagai berikut:

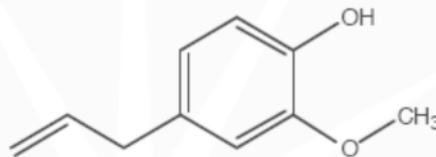
Kerajaan	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Bangsa	: Piperales
Suku	: Piperaceae
Marga	: Piper
Jenis	: <i>Piper crocatum</i> Ruiz and Pav.

Tanaman sirih merah dapat tumbuh dengan baik di tempat yang teduh dan tidak terlalu banyak terkena sinar matahari, agar warna merah daunnya tidak menjadi pudar, buram, kurang menarik. Tanaman sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz and Pav.) memiliki sosok eksotik, dengan permukaan daunnya bergelombang disertai warna daun hijau, *pink*, dan perak pada permukaan atas daun, serta warna merah keunguan pada permukaan bawah daun (Sudewo, 2005).

B. Metabolit Sekunder Eugenol

Eugenol memiliki bau dan aroma yang khas pada minyak cengkeh. Considine dan Considine (1982) menyatakan bahwa eugenol murni merupakan

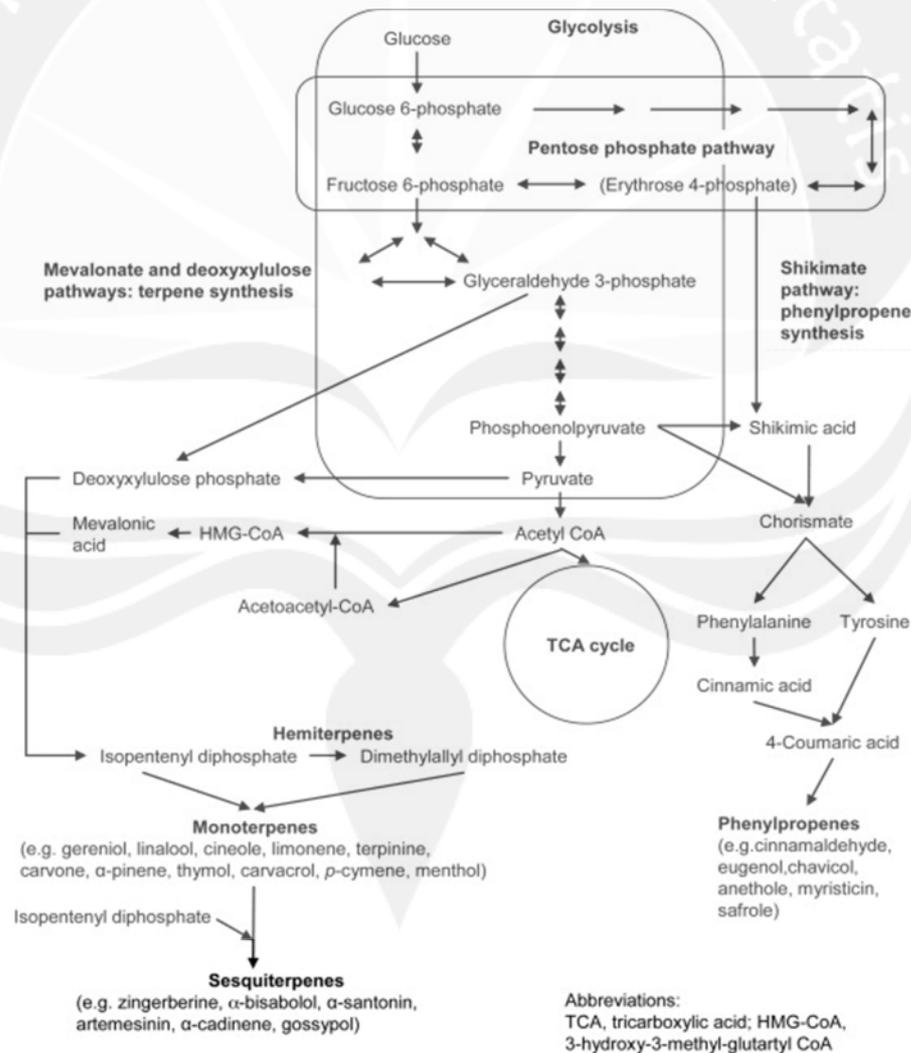
cairan tidak berwarna, berbau keras, dan mempunyai rasa pedas. Eugenol mudah berubah menjadi kecoklatan apabila dibiarkan di udara terbuka. Saat ini eugenol banyak digunakan sebagai pemberi aroma pada sabun, makanan, daging, dan kembang gula. Pemanfaatan eugenol dalam bidang industri masih terbatas pada industri parfum (Chairil, 1994). Eugenol yang terkandung dalam daun sirih dapat berkhasiat sebagai antiseptik (Heyne, 1987; Sastrohamidjojo, 2004). Penggunaannya dalam pengobatan gigi sebagai antibakteri, juga sebagai analgesik dan antioksidan (Heyne, 1987; Lei dkk., 2003). Struktur Eugenol dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Struktur Kimia Eugenol
(Sumber: DepKes, 1995).

Menurut Wijayakusuma (1992), kandungan eugenol pada tanaman sirih lebih dari 42 persen. Eugenol merupakan senyawa yang mampu menghambat pertumbuhan jamur bahkan dapat mematikan. Eugenol dapat menyebabkan lisis pada miselium jamur (Curl dan Johnson, 1972). Menurut Sanger (2010), Senyawa fenolik yang terkandung dalam daun sirih dapat menghambat oksidasi lemak sehingga mencegah kerusakan lemak. Kandungan senyawa fenolik pada ekstrak daun sirih seperti eugenol, kavikol dan hidrokavikol dapat menghambat oksidasi lemak.

Eugenol merupakan salah satu komponen minyak atsiri turunan fenil propanoid dalam minyak cengkeh (Harborne, 1987). Turunan fenil propanoid merupakan senyawa aromatik yang terbentuk melalui jalur biosintesis asam sikimat. Fenil propanoid berasal dari suatu unit senyawa sederhana yang terdiri gabungan inti *benzene* (fenil) dan *propane*. Senyawa ini di dalam tanaman dibentuk dari suatu asam amino aromatik fenilalanin dan tirosin yang akhirnya disintesis lewat jalur asam sikimat (Tyler dkk., 1976). Gambar biosintesis senyawa eugenol melalui jalur sikimat dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Jalur Shikimat
(Sumber: Benchaar and Greathead, 2009).

Eugenol merupakan senyawa tidak atau kurang larut dalam pelarut polar, sehingga pada fraksinasi digunakan pelarut non polar dan semi polar (Moeljatno, 2003). Eugenol (2-metoksi-4-alil-(2-propena) fenol atau 4-alil-2-metoksifenol, $C_{10}H_{12}O_2$) merupakan komponen kimia utama dalam minyak daun cengkeh, yaitu sebesar 70-90% volumenya (Ketaren, 1985), sedangkan menurut Guenther (1950) eugenol merupakan komponen utama minyak cengkeh yaitu 80-90%. Hasil penelitian Deyena dan Horiguchi (1971) menyebutkan bahwa minyak cengkeh mengandung eugenol 80,70%, sedangkan Chakrabarki dan Ghosh (1974) menemukan eugenol 80-93% dalam minyak cengkeh yang berasal dari daerah Benggali Barat (India). Menurut Manopo (2008), selain pada cengkeh, eugenol terdapat pula pada pala, kulit manis, salam dan daun sirih.

C. Kultur *in vitro* dan Induksi Kalus Untuk Menghasilkan Metabolit Sekunder

Menurut Hartman dan Kester (1983), kultur jaringan tanaman merupakan suatu cara menumbuhkan jaringan tanaman (kalus, sel protoplas) dan organ tanaman (batang, akar, embrio) menjadi tanaman yang lengkap dalam kultur aseptik atau *in vitro*. Dodds dan Roberts (1985), menyatakan bahwa pelaksanaan teknik *in vitro* sebenarnya berdasarkan teori sel Schleiden dan Schwann yang mengungkapkan bahwa tiap sel dari suatu organisme memiliki totipotensi. Totipotensi merupakan kemampuan setia sel dari mana saja sel tersebut diambil yang jika diletakkan dalam lingkungan yang sesuai akan dapat tumbuh menjadi tanaman lengkap sesuai induknya. Hartman dan Kester (1983)

dan Kartha (1990) menyatakan bahwa proses yang menginduksi pembentukan jaringan, sel, atau kalus menjadi tunas, tunas adventif, dan atau akar hingga akhirnya menjadi tanaman yang sempurna disebut organogenesis.

Menurut Zulkarnain (2009) aplikasi teknik kultur jaringan tanaman memiliki manfaat utama yaitu memperbanyak klon atau memperbanyak massa dari tanaman. Adapun manfaat-manfaat lain dari kultur jaringan dalam beberapa hal khusus yaitu:

1. Memperbanyak klon secara cepat yang pada prinsipnya setiap sel dapat diinduksi untuk beregenerasi menjadi individu tanaman lengkap. Dalam waktu singkat dapat dihasilkan individu tanaman dalam jumlah yang besar.
2. Kondisi aseptik kultur jaringan tanaman mampu menyediakan bahan tanaman yang bebas patogen dalam jumlah yang besar. Melalui kultur meristem, dapat diregenerasikan tanaman yang bebas virus.
3. Produksi tanaman pada teknik kultur jaringan tidak tergantung pada musim sehingga melalui teknik ini terbuka peluang untuk memperbanyak tanaman di sepanjang tahun.
4. Pelestarian plasma nutfah menggunakan ruang yang kecil dan mudahnya menciptakan kondisi yang sesuai, menjadikan kultur jaringan sebagai suatu cara praktis untuk menyimpan bahan tanaman dari genotipe terpilih baik tanaman pertanian maupun tanaman langka yang terancam punah.

5. Memperbanyak tanaman yang sulit diperbanyak secara vegetatif konvensional, dapat dilakukan dengan manipulasi terhadap lingkungan kultur (perlakuan hormon, cahaya, suhu) atau dengan menggunakan bahan eksplan yang memiliki daya meristematik tinggi.

Keberhasilan dalam penggunaan metode kultur jaringan sangat bergantung pada media yang digunakan. Media kultur jaringan tanaman menyediakan tidak hanya unsur hara makro dan mikro, tetapi juga karbohidrat yang pada umumnya berupa gula untuk menggantikan sumber energi dan karbohidrat yang didapat melalui fotosintesis (Gunawan, 1987).

Menurut Hendaryono dan Wijayani (1994), faktor-faktor penunjang keberhasilan teknik kultur jaringan antara lain:

1. Stabilitas genetik perlu diperhatikan agar tidak terjadi mutasi (keragaman somaklonal).
2. Seleksi terhadap bahan eksplan yang akan digunakan, terutama seleksi terhadap patogen, mikroorganisme, dan virus.
3. Cara untuk mentransfer tanaman hasil teknik kultur jaringan ke media tanah harus diusahakan agar mudah dilakukan.
4. Kemampuan (sifat totipotensi) dari eksplan yang dibudidayakan harus diusahakan agar jangan sampai hilang, sebab semakin banyak subkultur maka kemampuan regenerasi semakin hilang.
5. Perhitungan biaya yang dibutuhkan.

Kalus adalah proliferasi massa jaringan yang belum terdiferensiasi. Massa sel ini terbentuk di seluruh permukaan irisan eksplan, sehingga semakin luas

permukaan irisan eksplan semakin cepat dan banyak kalus yang terbentuk (Hendaryono dan Wijayani, 1994). Terbentuknya kalus pada bagian eksplan yang terluka disebabkan oleh otolisis sel, dan dari sel yang rusak tersebut akan dihasilkan senyawa-senyawa yang akan merangsang pembelahan sel pada lapisan berikutnya (Gunawan, 1992).

Terbentuknya kalus disebabkan adanya penambahan zat pengatur eksogen (Sudirga, 2002). Kondisi warna kalus yang bervariasi menurut Hendaryono dan Wijayani (1994) dapat disebabkan oleh adanya pigmentasi, pengaruh cahaya dan bagian tanaman yang dijadikan sumber eksplan. Tanda bahwa kalus yang diregenerasikan dapat membentuk tunas antara lain terjadinya perubahan warna dari kecoklatan atau dari kuning menjadi putih kekuningan selanjutnya menjadi kehijauan, perubahan warna tersebut merupakan tanda adanya morfogenesis (Lestari dan Mariska, 2003).

Kalus dapat diinisiasi dari hampir semua bagian tanaman, tetapi organ yang berbeda menunjukkan kecepatan pembelahan sel yang berbeda menunjukkan kecepatan pembelahan sel yang berbeda pula. Jaringan-jaringan yang sedang aktif membelah pada awal masa pertumbuhan biasanya merupakan eksplan yang baik. Bagian tanaman seperti embrio muda, hipokotil, kotiledon, batang muda merupakan bagian yang mudah untuk diferensiasi dan menghasilkan kalus (Hartman dkk., 1990).

Kultur *in vitro* dapat digunakan untuk memproduksi metabolit sekunder sebagai sumber aroma dan wangi-wangian, rada, *bioplastic*, dan *biofuel*, enzim, kosmetik, pewarna alami, dan komponen bioaktif (Karuppusamy, 2009).

Menurut Tabata (1977), keuntungan produksi metabolit sekunder melalui kultur *in vitro* tumbuhan adalah sebagai berikut:

1. Melalui kultur *in vitro* tumbuhan dapat dibentuk senyawa yang bermanfaat dalam kondisi terkontrol dan dalam waktu yang relatif lebih singkat.
2. Sel-sel tumbuhan dapat diperbanyak dengan mudah untuk memperoleh metabolit tertentu.
3. Pertumbuhan sel secara otomatis terawasi dan proses metabolisme dapat diatur secara rasional.
4. Hasil produksi yang diperoleh lebih konsisten, baik dalam kualitas maupun kuantitas.
5. Melalui kultur *in vitro* tumbuhan dapat dibentuk senyawa baru yang tidak terdapat dalam tanaman induknya dan senyawa baru ini mungkin berguna untuk dikembangkan atau dimanfaatkan lebih jauh.
6. Kultur tidak bergantung pada kondisi lingkungan seperti keadaan geografis, iklim, musim, dan tidak memerlukan lahan yang luas.

D. Eksplan

Eksplan adalah potongan/bagian jaringan yang diisolasi dari tanaman yang digunakan untuk inisiasi suatu kultur *in vitro* (Sandra dan Karyaningsih 2000). Menurut Hendaryono dan Wijayani (1994) bahwa eksplan yang dipilih harus merupakan bagian-bagian tanaman yang mempunyai sel aktif membelah (sel

meristem), karena pada bagian-bagian sel ini mengandung hormon tanaman yang baik untuk membantu pertumbuhan.

Eksplan pada prinsipnya dapat diambil dari semua bagian tanaman baik dari jaringan akar, batang, dan daun. Biasanya sebagai bahan eksplan dipilih bagian-bagian jaringan yang belum banyak mengalami perubahan bentuk dan kekhususan fungsi atau dipilih bagian-bagian yang bersifat meristematik (Majnu 1975 dalam Wattimena dkk., 1986). Pemakaian tunas pucuk, tunas samping, tunas bunga, daun bunga, daun, cabang muda, akar, umbi, bagian-bagian embrio, anther, dan beberapa bagian lainnya sering dilakukan dalam kultur jaringan beberapa tanaman tertentu (Haramaki dan Heuser 1980 dalam Wattimena dkk., 1986).

E. Media Tanam Kultur *in vitro*

Keseimbangan nutrisi dalam media tumbuh sangat mempengaruhi pertumbuhan kalus maupun diferensiasinya membentuk tunas. Morfogenesis eksplan tergantung kepada keseimbangan auksin dan sitokinin di dalam media dan interaksi antara zat pengatur tumbuh endogen di dalam tanaman dan zat pengatur tumbuh eksogen yang diserap dari media tumbuh (Wattimena dkk., 1992).

Medium yang sering digunakan untuk kultur *in vitro* adalah medium Murashige and Skoog (Medium MS). Medium MS terdiri dari unsur makro dan mikro yang menunjang pertumbuhan tanaman, selain itu juga terdapat unsur tambahan seperti vitamin dan Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) (Lampiran 2).

Medium MS layak untuk memenuhi kebutuhan banyak jenis sel tanaman dalam kultur (Gunawan, 1987).

Setiap tanaman membutuhkan paling sedikit 16 unsur hara untuk pertumbuhannya yang normal. Tiga unsur diantaranya adalah C, H, O yang diambil dari udara, sedangkan 13 unsur lain berupa pupuk yang dapat diberikan melalui akar atau melalui daun. Semua unsur tersebut dibutuhkan oleh tanaman untuk pertumbuhannya. Ada unsur yang dibutuhkan tanaman dalam jumlah besar yang disebut unsur makro, ada pula yang dibutuhkan oleh tanaman dalam jumlah sedikit tetapi harus tersedia yang disebut unsur mikro (Suryowinoto, 1991).

Media kultur *in vitro* tanaman tidak hanya menyediakan unsur hara makro dan mikro tetapi juga karbohidrat. Umumnya berupa gula untuk menggantikan karbon yang biasanya didapat dari atmosfer melalui fotosintesa. Penggunaan larutan garam-garam makro berkonsentrasi rendah lebih baik daripada larutan dengan konsentrasi tinggi (Herawan dan Na'iem, 2006).

F. Zat Pengatur Tumbuh

Pertumbuhan memerlukan penyerapan air yang berarti bahwa sel tersebut harus mempertahankan potensial airnya agar selalu negatif daripada potensial air larutan di sekitarnya. Pemberian auksin menyebabkan sel penerima mengeluarkan ion H^+ ke dinding sel yang mengelilinginya dan ion H^+ ini kemudian menurunkan pH sehingga terjadi pengenduran dinding sel dan pertumbuhan yang cepat. Diduga pH rendah inilah yang bekerja mengaktifkan

beberapa enzim merusak dinding sel tertentu, yang tidak aktif pada pH yang lebih tinggi. Enzim tersebut diduga memutuskan ikatan pada polisakarida dinding sel sehingga memungkinkan dinding sel lebih meregang (Salisbury dan Ross, 1991).

Zat pengatur tumbuh adalah molekul-molekul yang kegiatannya mengatur reaksi-reaksi metabolik penting. Zat tumbuh mencakup hormon tumbuhan (alami) dan senyawa-senyawa buatan yang dapat mengubah tumbuh dan perkembangan tumbuhan (Suwarsono, 1986). Zat pengatur tumbuh tanaman dapat dibedakan menjadi zat pengatur tumbuh endogen dan eksogen. Zat pengatur tumbuh endogen disebut fitohormon, sedangkan zat pengatur tumbuh sintetik terdiri dari lima golongan yaitu auksin, giberelin, sitokinin, asam absisik, dan etilen dalam berbagai bentuk (Wattimena, 1988).

Zat pengatur tumbuh terdiri dari golongan sitokinin dan auksin. Auksin mempunyai peran ganda tergantung pada struktur kimia, konsentrasi, dan jaringan tanaman yang diberi perlakuan. Auksin pada umumnya digunakan untuk menginduksi pembentukan kalus, kultur suspensi, dan akar, yaitu dengan memacu pemanjangan dan pembelahan sel di dalam jaringan kambium (Pierik, 1987).

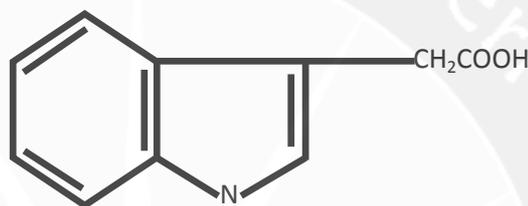
Zat pengatur tumbuh tanaman berperan penting dalam mengontrol proses biologi dalam jaringan tanaman (Davies, 1995; Gaba, 2005). Perannya antara lain mengatur kecepatan pertumbuhan dari masing-masing jaringan dan mengintegrasikan bagian-bagian tersebut guna menghasilkan bentuk yang kita kenal sebagai tanaman. Aktivitas zat pengatur tumbuh di dalam pertumbuhan

tergantung dari jenis, struktur kimia, konsentrasi, genotipe tanaman serta fase fisiologi tanaman (Satyavathi dkk., 2004; George, 1993; Dodds dan Roberts, 1982). Proses pembentukan organ seperti tunas atau akar ada interaksi antara zat pengatur tumbuh eksogen yang ditambahkan ke dalam media dengan zat pengatur tumbuh endogen yang diproduksi oleh jaringan tanaman (Winata, 1987). Penambahan auksin atau sitokinin ke dalam media kultur dapat meningkatkan konsentrasi zat pengatur tumbuh endogen di dalam sel, sehingga menjadi “faktor pemicu” dalam proses tumbuh dan perkembangan jaringan. Pembentukan tunas dapat dipacu dengan memanipulasi dosis auksin dan sitokinin eksogen (Poonsapaya dkk., 1989).

G. Zat Pengatur Tumbuh 2,4-Diklorofenoksiasetat, Asam Indol Asetat, dan Asam Naftalen Asetat

Auksin merupakan istilah umum untuk substansi pertumbuhan yang khususnya merangsang perpanjangan sel, tetapi auksin juga menyebabkan suatu kisaran respon pertumbuhan yang agak berbeda-beda (Gardener dkk., 1995). Peran fisiologis auksin adalah memacu pemanjangan sel batang dan koleoptil, inisiasi akar, diferensiasi jaringan pembuluh, respon tropik, perkembangan tunas samping, dan perkembangan bunga dan buah (Davies, 1991). Sejumlah substansi alami menunjukkan aktivitas auksin, tetapi yang dominan yang pertama kali ditemukan dan diidentifikasi ialah Asam Indol Asetat (IAA). IAA terdapat di akar, pada konsentrasi yang hampir sama dengan di bagian tumbuhan lainnya. Sejak pertama kali dikemukakan pada tahun 1930-an, pemberian auksin memacu pemanjangan potongan akar atau

bahkan akar utuh pada banyak spesies tapi hanya pada konsentrasi yang sangat rendah tergantung spesies dan umur tanaman. Pemberian auksin Pada konsentrasi yang tinggi dapat menghambat pertumbuhan akar (Gardner dkk., 1995). IAA di alam diidentifikasi sebagai auksin yang aktif di dalam tumbuhan (endogenous) yang diproduksi dalam jaringan meristematik seperti contohnya tunas (Hoesen dkk., 2000). Struktur kimia IAA dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Struktur Kimia IAA
(Sumber: Saad dan Elshahed, 2012).

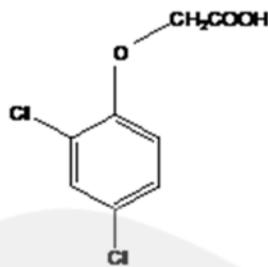
Auksin di dalam tubuh tanaman dihasilkan oleh pucuk-pucuk batang, pucuk-pucuk cabang dan ranting yang menyebar luas ke dalam seluruh tubuh tanaman. Penyebaran luas auksin ini arahnya dari atas ke bawah hingga sampai pada titik tumbuh akar, melalui jaringan pembuluh tipis (floem) atau jaringan parenkim (Hendaryono dan Wijayani, 1994).

Auksin sangat dikenal sebagai hormon yang mampu berperan menginduksi terjadinya kalus, mendorong proses morfogenesis kalus membentuk akar atau tunas, mendorong proses embriogenesis, dan dapat mempengaruhi kestabilan genetik sel tanaman (Santoso dan Nursandi, 2002). Peran auksin adalah merangsang pembelahan dan pembesaran sel yang terapat pada pucuk tanaman, dan menyebabkan pertumbuhan pucuk-pucuk baru (Wetherell, 1982). Pemberian auksin dengan kadar yang relatif tinggi,

diferensiasi kalus cenderung ke arah pembentukan primordia akar (Hendaryono, dan Wijayani, 1994).

Asam 2,4 diklorofenoksiasetat (2,4-D) merupakan golongan auksin yang sering digunakan untuk menginduksi pembentukan kalus embriogenik. Hormon ini mempunyai sifat stabil karena tidak mudah terurai oleh enzim-enzim yang dikeluarkan oleh sel atau saat pemanasan pada proses sterilisasi, lebih tersedia, lebih murah dan paling efektif dalam memacu pembentukan kalus (Hendaryono dan Wijayani, 1994). Penambahan 2,4-D dalam media akan merangsang pembelahan dan pembesaran sel pada eksplan sehingga dapat memacu pembentukan dan pertumbuhan kalus serta meningkatkan senyawa kimia alami flavonoid (Rahayu dkk., 2003). Konsentrasi hormon yang diberikan dalam medium pertumbuhan bervariasi tergantung jenis tanaman. Konsentrasi 2,4-D yang biasa digunakan pada tanaman monokotil adalah 2,0-10 mg/L dan konsentrasi 2,4-D pada tanaman dikotil yang menunjukkan pertumbuhan kalus adalah 0,001-2,0 mg/L (George dan Sherrington, 1984).

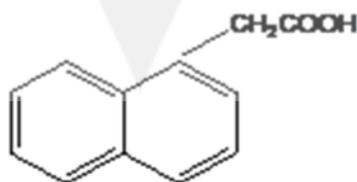
Menurut Wattimena (1988) 2,4-D adalah auksin sintetik yang tidak diproduksi sendiri oleh tanaman. Wetherell (1982) menyatakan 2,4-D merupakan auksin yang lebih stabil dan lebih kuat dari jenis auksin lainnya karena lambat diuraikan oleh sel tumbuhan dan stabil pada pemanasan dengan autoklaf. Salah satu faktor yang mempengaruhi aktivitas auksin sintetik yaitu kemampuan auksin tersebut berinteraksi dengan hormon tumbuhan lainnya (Wattimena, 1988). Struktur kimia 2,4-D dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Struktur Kimia 2,4-D
(Sumber: Saad dan Elshahed, 2012).

Senyawa 2,4-D lebih efektif dibandingkan auksin yang lain untuk meningkatkan perkembangan dan proliferasi kultur embriogenik. Senyawa 2,4-D mendorong pertumbuhan embrio somatik pada embriogenesis. Konsentrasi 2,4-D yang rendah akan memblokir ekspresi gen-gen yang dibutuhkan untuk perubahan bentuk ke tahap hati (Zimmerman, 1993). Zat pengatur tumbuh 2,4-D pada konsentrasi rendah akan menginduksi terbentuknya kalus, tetapi pada konsentrasi tinggi akan menyebabkan timbulnya mutasi karena 2,4-D bersifat racun (herbisida) dan akan menyebabkan perubahan jaringan tanaman (Goldsworthy dan Mina, 1991).

Zat pengatur tumbuh NAA merupakan ZPT yang sering digunakan dalam kultur jaringan. Jika penggunaan konsentrasi NAA lebih tinggi daripada sitokinin, maka dapat mempercepat inisiasi akar. Golongan auksin dalam konsentrasi rendah akan memacu akar adventif sedangkan konsentrasi tinggi mendorong terbentuknya kalus (Pierik, 1987). Struktur kimia NAA dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Struktur Kimia NAA
(Sumber: Saad dan Elshahed, 2012).

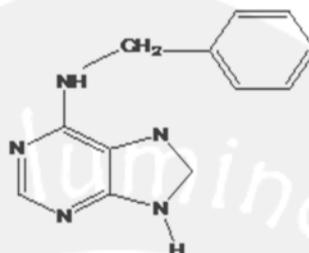
Senyawa NAA merupakan zat pengatur tumbuh sintetis yang mampu mengatur berbagai proses pertumbuhan dan pemanjangan sel (George dan Sherrington, 1984), mempunyai sifat stabil dan tidak mudah terurai oleh enzim yang dikeluarkan sel atau pemanasan pada proses sterilisasi dibandingkan golongan auksin lainnya (Hendaryono, 1994), mempunyai stabilitas kimia besar dan mobilitas rendah (Hartman dan Kester, 1983).

H. Zat Pengatur Tumbuh Benzil Adenina

Sitokinin adalah suatu senyawa kimia yang terbatas pada turunan 6-substitusi purine (adenin), yang mendorong pembelahan sel pada sistem jaringan tanaman Salisbury dan Ross (1992). Selanjutnya Salisbury dan Ross (1995) menyatakan sitokinin merupakan zat pengatur tumbuh yang fungsi utamanya adalah memacu pertumbuhan tanaman. Gunawan (1992) menyatakan sitokinin (kinin) merupakan salah satu golongan sitokinin yang biasa digunakan dalam kultur jaringan adalah 6-benzil aminopurin/6-benzil adenina (BAP/BA).

Peran utama fisiologis sitokinin adalah mendorong pembelahan sel. Aktivitas sitokinin yang mendorong pembelahan sel menjadi kriteria utama untuk menggolongkan suatu zat sebagai sitokinin (Wattimena, 1988). Bhojwani dan Razdan dalam Avivi dan Parawita (2005) menyatakan bahwa semakin tinggi konsentrasi sitokinin yang ditambahkan pada media kultur, maka jumlah tunas yang terbentuk semakin bertambah, tetapi masing-masing pertumbuhan tunasnya terhambat. Menurut Hendaryono dan Wijayani (1994),

pemberian sitokinin yang relatif tinggi deferensiasi kalus cenderung ke arah pembentukan primordia batang atau tunas. Struktur kimia BA dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Struktur Kimia BA
(Sumber: Saad dan Elshahed, 2012).

Senyawa BA merupakan sitokinin yang paling banyak dipakai dalam kultur jaringan (Zaerr & Mapes 1982; Hu & Wang 1983). Hal ini disebabkan BA stabil, murah, tersedia dan efektif digunakan dibandingkan jenis sitokinin alami. Zaerr dan Mapes (1982) menyatakan bahwa penggunaan BA baik untuk menghasilkan plantlet dibandingkan sitokinin alami, disebabkan oleh kemampuan jaringan tanaman untuk memetabolisme hormon-hormon alami lebih cepat daripada ZPT sintetik lainnya.

Konsentrasi BA untuk induksi kalus yaitu 0,4 – 4,7 μM dengan rata-rata 1,9 μM (\gg 0,43 mg) dan untuk induksi tunas adventif selang konsentrasi BA yaitu 0,05 – 44,4 μM dengan rata-rata 14,5 μM (\gg 3.265 mg/l) (Ammirato dkk., 1982; Tisserat, 1985).

I. Ekstraksi dan Analisis Kandungan Eugenol

Isolasi eugenol dapat dilakukan melalui beberapa jenis proses pemurnian (isolasi), di antaranya, yaitu proses ekstraksi, distilasi fraksionasi (rektifikasi),

kromatografi kolom, ekstraksi superkritik, dan distilasi molekuler (Anny, 2002). Prinsip ekstraksi adalah melarutkan senyawa polar dalam pelarut polar dan senyawa nonpolar dalam senyawa nonpolar (Harborne, 2006). Eugenol memiliki sifat mudah menguap maka akan dilakukan analisis menggunakan Kromatografi Gas Shimadzu-FID. Kromatografi gas adalah suatu proses dengan mana suatu campuran menjadi komponen-komponennya oleh fase gas yang bergerak melewati suatu lapisan serapan (Sorben) yang stasioner (Basett dkk., 1994).

J. Sterilisasi Eksplan

Menurut Sandra (2003), prinsip dasar sterilisasi eksplan adalah mensterilkan eksplan dari berbagai mikroorganisme, tetapi eksplannya tidak ikut mati. Setiap tanaman memerlukan perlakuan khusus sehingga sebelum mengulurkan tanaman baru perlu melakukan percobaan sterilisasi. Patokan konsentrasi bahan dan waktu yang diperlukan untuk sterilisasi eksplan sebagai berikut :

1. Sterilisasi Ringan

Eksplan direndam dalam cairan pemutih pakaian 20% selama 10 menit, lalu bilas dengan air steril. Setelah itu, eksplan direndam dalam cairan pemutih pakaian 15% selama 10 menit, lalu bilas dengan air steril. Terakhir, eksplan direndam dalam cairan pemutih pakaian 10% selama 10-15 menit, lalu bilas dengan air steril tiga kali.

2. Sterilisasi Sedang

Eksplan direndam dalam HgCl₂ 0,1-0,5 mg/l selama 7 menit, lalu bilas dengan air steril. Setelah itu, eksplan direndam dalam cairan pemutih pakaian 15% selama 10 menit, lalu bilas dengan air steril. Terakhir, eksplan direndam dalam cairan pemutih pakaian 10% selama 10 menit, lalu bilas dengan air steril tiga kali.

3. Sterilisasi Keras

Eksplan direndam dalam HgCl₂ 0,1-0,5 mg/l selama 10 menit, lalu bilas dengan air steril. Setelah itu, eksplan direndam dalam alkohol 90% selama 15 menit, lalu bilas dengan air steril. Terakhir, eksplan direndam dalam cairan pemutih pakaian 20% selama 10 menit, lalu bilas dengan air steril tiga kali.

Menurut Gunawan (1987), setiap bahan tanaman mempunyai tingkat kontaminasi permukaan yang berbeda, tergantung dari :

1. Jenis tanamannya.
2. Bagian tanaman yang dipergunakan.
3. Morfologi permukaan (misalnya berbulu atau tidak).
4. Lingkungan tumbuhnya (*Green house* atau lapang).
5. Musim waktu mengambil (musim hujan atau kemarau).
6. Umur tanaman (*seedling* atau tanaman dewasa).
7. Kondisi tanamannya (sehat atau sakit).

K. Hipotesis

1. Kalus yang dihasilkan dari kultur *in vitro* sirih merah dapat menghasilkan senyawa eugenol.
2. Konsentrasi ZPT dalam medium ½ MS yang cepat menginduksi kalus adalah BA 2 mg/L dengan 2,4-D 0,5 mg/L; BA 2 mg/L dengan NAA 0,5 mg/L.

