

**KECEPATAN INDUKSI KALUS DAN KANDUNGAN EUGENOL SIRIH MERAH
(*Piper crocatum* Ruiz and Pav.) YANG DIPERLAKUKAN MENGGUNAKAN VARIASI
JENIS DAN KONSENTRASI AUKSIN**

**Callus Induction Rate and Eugenol Content of Red Betel(*Piper crocatum* Ruiz and Pav.)
Treated Using a Variation of The Type and Concentration of Auksin**

Lidya Kartika¹⁾ P. Kianto Atmodjo²⁾ L.M. Ekawati Purwijantiningsih³⁾
Universitas Atma Jaya Yogyakarta

Intisari

One of the necessary plant and used as a source of medicine is a red betel. Red betel leaves contain active compounds one of which is eugenol. The study aims to determine the optimal concentration of the addition of PGR in ½ MS medium which can provide a positive influence on the speed of callus induction and production of eugenol quantitatively. The design of the experiment was a completely randomized design used with 2,4-D treatment (0,5 and 1 mg/L), NAA (0,5 and 1 mg/L), IAA (0,5 and 1 mg/L). Quantitative parameters such as callus fresh weight, whereas parameters such as time kualitatif initiation of callus formation, callus morphology, and the amount of content generated eugenol. Results showed callus from all treatments began to form in the third week after inoculation. The highest fresh weight of callus was found in the addition of 2,4-D 0,5 mg/L is equal to 11,155 grams. Morphology of callus formed on all treatments are compact, crumbs, then turned into a white translucent yellowish-green to clear. The content of eugenol on Red Betel callus tend to be higher than the content of eugenol on Red Betel leaf . The highest content of eugenol obtained from the addition of BA 2 mg/L is equal to 6,0345 mg/L per gram wet weight of callus.

Keywords: Auksin, Eugenol, Callus, Explant Sterilisation.

Pendahuluan

Penelitian kultur *in vitro* pada sirih merah masih sangat jarang. Penelitian yang telah banyak dilakukan terhadap sirih merah merupakan penelitian terhadap pengaruh ekstrak sirih merah tersebut sebagai antibakteri seperti pada penelitian Wardani dkk. (2012) yaitu meneliti pengaruh ekstrak daun sirih merah (*Piper crocatum*) terhadap bakteri *Aeromonas hydrophila* penyebab *septicemia*, dan penelitian Fitriyani dkk. (2011) antiinflamasi ekstrak methanol daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz and Pav.) pada tikus putih.

Penelitian Kelkar dkk., (1996) meregenerasikan tunas melalui kalus eksplan daun *Pepper colubrinum* Link. Induksi kalus dalam medium ½ MS dengan penambahan sitokinin berupa BA atau kinetin (0,5; 1; 2; 3 mg/L), atau dikombinasikan auksin NAA atau 2,4-D (0,5; 1 mg/L). Hasil terbaik diperoleh pada kombinasi BA dengan hormon-hormon auksin yaitu; BA 0,5 mg/L

dengan NAA 1 mg/L $100,0 \pm 0,0$ GW; BA 1 mg/L dengan 2,4-D 0,5 mg/L $100,0 \pm 0,0$ G; BA 1 mg/L dengan NAA 0,5 mg/L $100,0 \pm 0,0$ GW; BA 2 mg/L dengan 2,4-D 0,5 mg/L $100,0 \pm 0,0$ G; BA 2 mg/L dengan NAA 0,5 mg/L $100,0 \pm 0,0$ G; dan BA 3 mg/L dengan 2,4-D 1 mg/L $100,0 \pm 0,0$.

Berbeda dari penelitian-penelitian sebelumnya, penelitian ini akan dilakukan induksi kalus Sirih Merah dari eksplan daun muda dalam medium $\frac{1}{2}$ MS dengan penambahan sitokinin berupa BA 2 mg/L yang dikombinasikan dengan auksin 2,4-D, atau NAA, atau IAA (0,5; 1 mg/L). Variasi auksin dan sitokinin diharapkan dapat menginduksi kalus dan memaksimalkan produksi senyawa eugenol pada kalus Sirih Merah.

Metode Penelitian

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang dilaksanakan di Laboratorium Teknobiologi-Industri Fakultas Teknobiologi Universitas Atma Jaya Yogyakarta dan pengujian kandungan eugenol dilaksanakan di LPPT Universitas Gadjah Mada. Penelitian ini dilaksanakan mulai pada bulan Februari sampai Juli 2013.

B. Tahap Pelaksanaan

Pembuatan medium $\frac{1}{2}$ MS

Unsur-unsur makro, larutan *stock* mikro, besi, vitamin dan mioinositol dalam resep $\frac{1}{2}$ MS diambil dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer. Larutan ditambah larutan *stock* BA 200 ppm sebanyak 20 ml. Larutan dibagi ke dalam 7 erlenmeyer berbeda. Larutan dalam erlenmeyer 1 tidak ditambahkan larutan *stock* hormon apapun. Larutan dalam erlenmeyer 2 ditambahkan larutan *stock* hormon 2,4-D 200 ppm sebanyak 0,35 ml. Larutan dalam erlenmeyer 3 ditambahkan larutan *stock* hormon 2,4-D 200 ppm sebanyak 0,71 ml. Larutan dalam erlenmeyer 4 ditambahkan larutan *stock* hormon NAA 200 ppm sebanyak 0,35 ml. Larutan dalam erlenmeyer 5 ditambahkan larutan *stock* hormon NAA 200 ppm sebanyak 0,71 ml. Larutan dalam erlenmeyer 6 ditambahkan larutan *stock* hormon IAA 200 ppm sebanyak 0,35 ml. Larutan dalam erlenmeyer 7 ditambahkan larutan *stock* hormon IAA 200 ppm sebanyak 0,71 ml. Semua larutan dalam Erlenmeyer ditambahkan aquades steril sampai volume akhir 142,85 ml, dan masing-masing erlenmeyer ditambahkan gula sebanyak 2,14 gr

dan agar bakterional sebanyak 1,14 gr. Semua bahan dihomogenkan dengan menggunakan pengaduk magnetik. pH medium dalam masing-masing erlenmeyer diukur antara 5,6-5,8. Jika larutan terlalu asam maka ditambahkan KOH 1 N sampai pH 5,6-5,8. Jika larutan terlalu basa maka ditambahkan HCl 1 N sampai pH 5,6-5,8. Larutan dipanaskan hingga mendidih. Setelah itu medium dituangkan ke dalam botol kultur yang telah disterilisasi dan diberi label. Medium dan botol kultur disterilkan dengan menggunakan autoklaf pada tekanan 17,5 psi dan suhu 121⁰C selama 15 menit.

Sterilisasi, preparasi, dan penanaman eksplan

Sterilisasi dilakukan di dalam dan luar laminar air flow, karena eksplan daun berasal dari tanaman yang belum aseptis. Daun dicuci hingga bersih menggunakan detergen dan dibilas menggunakan air mengalir. Daun dipotong-potong, dan dimasukkan ke dalam aquades steril 100 ml dengan penambahan detergen 1 gr, eksplan digojok selama 20 menit. Eksplan dibilas menggunakan aquades steril selama 3 menit. Eksplan dipindahkan ke dalam botol selai berisi bakterisida sebanyak 1 gram dengan penambahan 2 tetes tween dalam 100 ml aquades steril, digojok selama 20 menit. Eksplan dibilas menggunakan aquades steril selama 3 menit. Eksplan dipindahkan ke dalam botol selai berisi fungisida sebanyak 1 gram dengan penambahan 2 tetes tween dalam 100 ml aquades steril, digojok selama 20 menit. Eksplan dibilas dengan aquades steril selama 3 menit. Eksplan dipindahkan ke dalam botol selai berisi antibiotik streptomycin sebanyak 5 mg dengan penambahan 2 tetes tween dalam 100 ml aquades steril, digojok selama 1 jam. Eksplan dibilas dengan aquades steril selama 3 menit.

Botol selai berisi eksplan disemprotkan alkohol 95% untuk mensterilkan luar botol selai dari mikroorganisme kontaminasi, lalu dibawa masuk ke dalam *laminar air flow*. Eksplan digojog menggunakan bayclin 15% selama 7 menit, bayclin 10% selama 7 menit, bayclin 5% selama 7 menit. Eksplan dibilas menggunakan aquades steril digojog selama 3 menit, kemudian ekplan digojog menggunakan aquades steril, dan diulangi sebanyak 3 kali masing-masing selama 3 menit. Tepi eksplan daun yang telah mati dipisahkan.

Eksplan daun yang telah dipotong-potong direndam dalam 15 ml larutan asam sitrat 300 ppm dengan ditambahkan 5 tetes betadine selama 30 menit. Eksplan kemudian ditanam di medium MS yang telah diberi variasi ZPT BA, 2,4-D, NAA, IAA secara aseptis untuk menumbuhkan kalus. Setelah itu mulut botol dibakar di atas Bunsen dan ditutup rapat

menggunakan plastik tahan panas, aluminium foil, dan plastik *wrap*. Botol kultur akan diletakkan di ruang inkubasi dan dilakukan pengamatan terhadap kalus yang terbentuk.

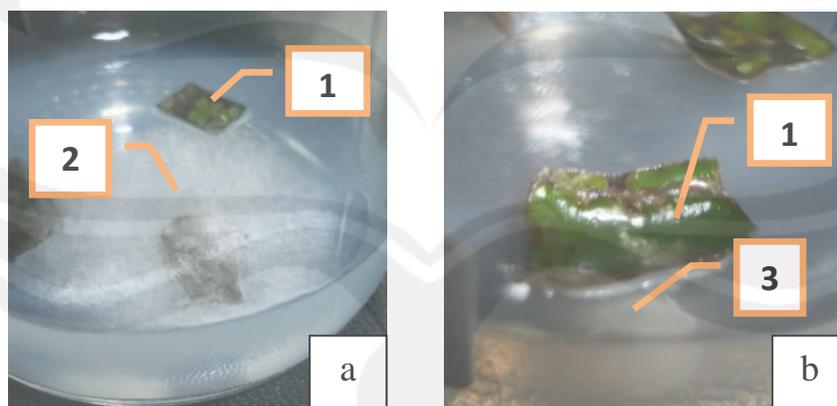
C. Analisis Data

Data kuantitatif untuk berat basah kalus dianalisis menggunakan metode ANAVA pada tingkat kepercayaan 95%. Analisis data ini menggunakan program SPSS versi 19. Data kualitatif seperti morfologi kalus, waktu inisiasi mulai terbentuknya kalus dianalisis menggunakan metode deskriptif dan besarnya kandungan senyawa eugenol dianalisis dengan kromatografi gas Shimadzu-FID.

Hasil dan Pembahasan

A. Kontrol Kontaminan

Kendala yang utama dalam kultur *in vitro* jika eksplan berasal dari lingkungan bebas adalah kontaminasi bakteri dan jamur yang sifatnya sistemik maupun dipermukaan eksplan. Pada penelitian ini, eksplan sirih merah memiliki kontaminasi bakteri dan jamur yang sifatnya sistemik dan dipermukaan eksplan sehingga diperlukan sterilisasi eksplan yang benar. Kontaminasi pada eksplan daun dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Kontaminasi pada eksplan daun

Keterangan: a = kontaminasi oleh jamur; b = kontaminasi oleh bakteri

1 = eksplan daun; 2 = Hifa putih jamur; 3 = bakteri berwarna putih

Sterilisasi adalah proses untuk mematikan atau menonaktifkan spora dan mikroorganisme sampai ke tingkat yang tidak memungkinkan lagi berkembang biak atau menjadi sumber kontaminan selama proses perkembangan berlangsung (Sandra dan Karyaningsih, 2000). Sterilisasi merupakan tahapan yang cukup penting yang

menentukan keberhasilan dalam melakukan kultur *in vitro*. Tabel 1. menunjukkan percobaan sterilisasi sampai diperoleh cara sterilisasi terbaik yang paling efisien.

Tabel 1. Hasil Optimasi Percobaan Sterilisasi

Jenis Sterilisasi	Sterilan	Kadar Sterilan	Sterilisasi 1	Sterilisasi 2	Sterilisasi 3
Seterilisasi di luar LAF	Detergen	-	✓	✓	✓
	Alkohol	96%	✓	✓	✓
	Detergen	1%	20 menit	20 menit	20 menit
	Fungisida Masalgin 50 wp	1%	20 menit	20 menit	20 menit + 2 tetes tween
	Bakterisida Agrept 20 wp	1%	20 menit	20 menit	20 menit + 2 tetes tween
	Antibiotik Streptomisin Sulfate	5%	1 jam	6 jam	1 jam + 2 tetes tween
Sterilisasi di dalam LAF	Bayclin	15% 10% 5%	7 menit	7 menit	7 menit
	Betadine	5 tetes dalam 10 ml aquades steril	x	✓	✓

Sterilisasi di luar LAF, daun sirih merah dicuci permukaannya sampai bersih, ditiriskan menggunakan kertas tisu, kemudian dibersihkan menggunakan tisu beralkohol. Sterilisasi di luar LAF dilanjutkan penggojogan detergen 1%, fungisida 1%, bakterisida 1%, antibiotik 5%. Sterilisasi di dalam LAF dilakukan penggojogan menggunakan bayclin 15%; 10%; 5% dan dilanjutkan perendaman 5 tetes betadine dalam 10 ml aquades steril.

Percobaan sterilisasi 1 di luar LAF dilakukan penggojogan menggunakan antibiotik hanya 1 jam, sedangkan di dalam LAF tidak dilakukan perendaman 5 tetes betadine dalam 10 ml aquades steril. Hasil dari percobaan sterilisasi 1 mengalami kontaminasi jamur dan bakteri dari seluruh eksplan yang diinokulasikan. Percobaan sterilisasi 2 di luar LAF dilakukan penggojogan menggunakan antibiotik selama 6 jam, dan di dalam LAF dilakukan perendaman 5 tetes betadine dalam 10 ml aquades steril. Hasil dari percobaan sterilisasi 2 seluruh eksplan yang diinokulasikan tidak mengalami

kontaminasi sama sekali, tetapi waktu sterilisasi menjadi sangat tidak efisien untuk inokulasi eksplan dalam jumlah yang sangat banyak. Percobaan sterilisasi 3 di luar *LAF* dilakukan penggojogan menggunakan fungisida 1%, bakterisida 1 % dengan penambahan 2 tetes tween selama 20 menit, kemudian penggojogan menggunakan antibiotik selama 1 jam dengan penambahan 2 tetes tween, dan di dalam *LAF* dilakukan perendaman 5 tetes betadine dalam 10 ml aquades steril. Hasil dari percobaan sterilisasi 3 tidak mengalami kontaminasi jamur dan bakteri dari seluruh eksplan yang diinokulasikan dengan waktu sterilisasi yang lebih efisien dibandingkan percobaan sterilisasi 2. Percobaan sterilisasi 3 digunakan sebagai cara kerja untuk sterilisasi eksplan dalam penelitian ini.

B. Waktu Inisiasi Terbentuknya Kalus

Menurut Santoso dan Nursandi (2001), bagian eksplan yang terinisiasi membentuk kalus disebabkan sel-sel yang kontak dengan medium terdorong meristematik dan selanjutnya aktif mengadakan pembelahan seperti jaringan penutup luka, walaupun antara sel-sel pada bagian eksplan dengan bagian lain berbeda. Oleh karena itu diasumsikan perlakuan ZPT akan memengaruhi respon inisiasi pembentukan kalus berat kalus dan waktu inisiasi terbentuknya kalus (Tabel 2.).

Tabel 2. Waktu Inisiasi Terbentuknya Kalus Sirih Merah Berdasarkan Perlakuan ZPT (hari)

Parameter	Kontrol	Auksin					
		2,4-D		NAA		IAA	
	(A)	(B) 0,5	(C) 1	(D) 0,5	(E) 1	(F) 0,5	(G) 1
Hari	22	26	23	24	23	23	26
Jumlah yang muncul (potong eksplan dalam 1 botol)	1	1	1	1	1	1	3

Perlakuan A sebagai kontrol dalam medium $\frac{1}{2}$ MS mengandung BA 2 mg/L. Perlakuan B dalam medium $\frac{1}{2}$ MS mengandung BA 2 mg/L ditambahkan 2,4-D 0,5 mg/L. Perlakuan C dalam medium $\frac{1}{2}$ MS mengandung BA 2 mg/L ditambahkan 2,4-D 1 mg/L. Perlakuan D dalam medium $\frac{1}{2}$ MS mengandung BA 2 mg/L ditambahkan NAA 0,5 mg/L. Perlakuan E dalam medium $\frac{1}{2}$ MS mengandung BA 2 mg/L ditambahkan NAA 1 mg/L. Perlakuan F dalam medium $\frac{1}{2}$ MS mengandung BA 2 mg/L ditambahkan IAA 0,5 mg/L. Perlakuan G dalam medium $\frac{1}{2}$ MS mengandung BA 2 mg/L ditambahkan IAA 1 mg/L.

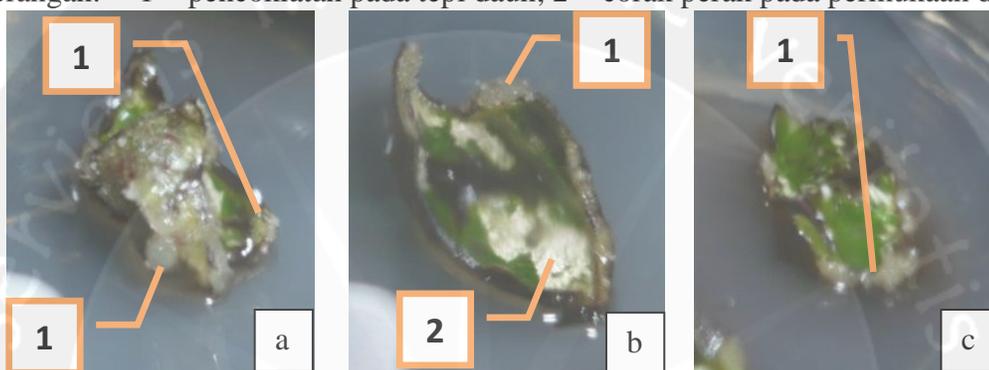
Waktu inisiasi terbentuknya kalus perlakuan A pada 22hari. Waktu inisiasi terbentuknya kalus perlakuan B pada 26 hari. Waktu inisiasi terbentuknya kalus perlakuan C pada 23 hari. Waktu inisiasi terbentuknya kalus perlakuan D pada 24 hari. Waktu inisiasi terbentuknya kalus perlakuan E pada 23 hari. Waktu inisiasi terbentuknya kalus perlakuan F pada 23 hari. Waktu inisiasi terbentuknya kalus perlakuan G pada 26 hari. Perlakuan A, B, C, D, E, F terbentuk kalus sebanyak 1 potong eksplan dalam 1 botol pada waktu inisiasi terbentuknya kalus masing-masing. Sedangkan perlakuan G terbentuk kalus sebanyak 3 potong eksplan dalam 1 botol.

Penggunaan kombinasi antara auksin dengan sitokininakan meningkatkan proses induksi kalus (Litz dkk., 1995). Efektivitas zat pengatur tumbuh auksin maupun sitoknin eksogen bergantung pada konsentrasi hormon endogen dalam jaringan tanaman (Bhaskaran dan Smith, 1990). Di lihat dari perlakuan ZPT yang diberikan, eksplan pada perlakuan kontrol memiliki waktu inisiasi kalus cenderung lebih cepat yaitu hari ke-22 daripada kalus yang diberikan perlakuan penambahan auksin. Perbedaan waktu inisiasi kalus mungkin disebabkan oleh penggunaan eksplan daun kedua sampai keempat dari pucuk daun yang memungkinkan keadaan sel yang menyusun eksplan berbeda-beda sehingga mempengaruhi kepekaan sel terhadap ZPT yang diberikan. Menurut Lakitan (1996) setiap sel mempunyai kepekaan yang berbeda-beda terhadap ZPT yang diberikan sehingga mempengaruhi waktu pembelahan sel untuk membelah diri menjadi tidak sama karena siklus sel yang berbeda-beda.

Tepi Eksplan daun muda yang baru diinokulasikan belum mengalami pencoklatan pada tepi daun (Gambar 2.). Pengamatan yang telah dilakukan menunjukkan pertumbuhan kalus diawali dengan mencoklatnya tepi daun (pada bekas luka). Daun melengkung sebagai respon pertumbuhan yang disertai pembengkakkan daun. Kemudian muncul gelembung-gelembung pada tepi daun yang bersentuhan langsung medium (Gambar 3.)



Gambar 2. Eksplan daun muda yang baru diinokulasikan
Keterangan: 1 = pencoklatan pada tepi daun; 2 = corak perak pada permukaan daun



Gambar 3. Inisiasi munculnya kalus Sirih Merah pada Eksplan Daun Muda Berumur 3 minggu
Keterangan: a, b, c = kalus yang muncul pada eksplan daun muda pada minggu ke-3; 1 = kalus; 2 = corak perak daun

C. Berat Basah Kalus

Biomassa yang dihasilkan pada kultur jaringan sangat tergantung pada kecepatan sel-sel tersebut membelah diri, memperbanyak diri yang dilanjutkan dengan pembesaran sel. Kecepatan sel membelah dapat dipengaruhi oleh adanya kombinasi auksin-sitokinin tertentu dalam konsentrasi yang tertentu tergantung pada tanamannya, juga faktor-faktor luar seperti intensitas cahaya dan temperatur (Wattimena dkk., 1992).

Hasil analisis statistik (Tabel 3.) menunjukkan adanya beda nyata terhadap rata-rata berat kalus pada perlakuan A (kontrol), dengan perlakuan B, E, F, dan G, sedangkan antara perlakuan C dan D menunjukkan tidak ada beda nyata terhadap rata-rata berat kalus yang diperoleh. Berat basah tertinggi ditemukan pada kalus dengan penambahan 2,4-D 0,5 mg/L (perlakuan B).

Tabel 3. Berat Basah Kalus Sirih Merah Berdasarkan Perlakuan ZPT Minggu Ke-6 (gram)

Kontrol	Auksin					
	2,4-D		NAA		IAA	
(A)	(B) 0,5	(C) 1	(D) 0,5	(E) 1	(F) 0,5	(G) 1
3,6954 ^u	11,155 ^v	4,0097 ^w	4,0497 ^w	4,2071 ^x	7,3965 ^y	4,7324 ^z

Keterangan : Angka pada baris diikuti huruf yang berbeda menunjukkan beda nyata pada taraf kepercayaan 95%

Respon perkembangan berat basah kalus terhadap perlakuan ZPT yang terlihat pada eksplan daun sirih menunjukkan pola yang berbeda. Pola perkembangan kalus sebagai respon penambahan ZPT pada eksplan daun sirih merah menunjukkan bahwa pada perlakuan A diperoleh 3,6954 gram berat basah kalus; pada perlakuan B diperoleh 11,155 gram berat basah kalus; pada perlakuan C diperoleh 4,0097 gram berat basah kalus; pada perlakuan D diperoleh 4,0497 gram berat basah kalus; pada perlakuan E diperoleh 4,2071 gram berat basah kalus; pada perlakuan F diperoleh 7,3965 gram berat basah kalus; dan pada perlakuan G diperoleh 4,7324 gram berat basah kalus. Berat basah kalus tertinggi diperoleh pada perlakuan B, dan berat basah kalus terendah diperoleh pada perlakuan A.

Perlakuan A diperoleh berat kalus terendah hal ini mungkin disebabkan oleh kandungan ZPT yang hanya berupa BA (sitokinin), sedangkan untuk memicu perkembangan kalus tidak hanya dibutuhkan ZPT golongan sitokinin saja tetapi dibutuhkan juga ZPT golongan auksin. Menurut Abidin (1990), auksin dapat merubah aktivitas enzim-enzim yang berperan dalam sintesis komponen-komponen dinding sel dan menyusunnya kembali dalam suatu matriks dinding sel yang utuh sehingga akan berpengaruh terhadap berat sel. Menurut Wattimena (1991), auksin mendorong terjadinya elongasi sel yang diikuti dengan pembesaran sel dan meningkatnya berat basah. Peningkatan berat basah terutama disebabkan oleh meningkatnya penyerapan air oleh sel tersebut.

Hasil berat basah kalus yang berbeda-beda tersebut dikarenakan tidak semua sel memiliki respon yang sama terhadap suatu ZPT yang diberikan. Menurut Lakitan (1996), setiap sel mempunyai kepekaan sendiri terhadap ZPT yang diberikan, selain itu waktu pembelahan sel untuk memperbanyak diri tidaklah sama karena siklus selnya akan selalu

berbeda-beda. Perbedaan laju pertumbuhan juga dipengaruhi oleh kemampuan jaringan untuk menyerap zat-zat hara yang tersedia, hal ini banyak dipengaruhi oleh aerasi dan tekstur kalus. Kalus yang terlalu padat dan kompak mempunyai kemampuan menyerap zat hara lebih rendah daripada tekstur kalus yang tidak terlalu padat.

D. Morfologi Kalus

Morfologi perkembangan kalus pada perlakuan kontrol, 2,4-D 0,5 dan 1 mg/L; NAA 0,5 mg/L sedikit berbeda dengan perlakuan NAA 1 mg/L; dan IAA 0,5 dan 1 mg/L. Pada perlakuan kontrol, 2,4-D 0,5 dan 1 mg/L; NAA 0,5 mg/L kalus yang berumur 22-26 hari diawali dengan pembentukan kalus berwarna putih yang terlihat seperti benang-benang halus berupa miselium, sedangkan pada perlakuan NAA 1 mg/L; dan IAA 0,5 dan 1 mg/L kalus berwarna putih yang terbentuk diawali dengan pembengkakan daun dalam waktu relatif lebih lama dan lebih tebal. Kemudian pada semua perlakuan kalus yang berumur 28-33 hari menjadi bening kehijauan. Warna kehijauan ini menunjukkan adanya kandungan klorofil pada kalus. Kalus berwarna kuning bening setelah berumur 40 hari, hal ini kemungkinan karena mulai terbentuknya senyawa fenol dari jaringan dan semakin dewasanya umur kalus. Menurut Wattimena (1991), senyawa-senyawa fenol dapat menghambat pembelahan sel, perbesaran sel dan pertumbuhan.

Beberapa macam tanaman khususnya tanaman tropika mempunyai kandungan senyawa fenol yang tinggi dan teroksidasi ketika sel dilukai atau terjadi senesens (George dan Sherrington, 1984). Akibatnya jaringan yang diisolasi menjadi coklat atau kehitaman dan gagal tumbuh. Pencoklatan jaringan terjadi karena aktivitas enzim oksidase yang mengandung tembaga seperti polifenol oksidase dan tirosinase (Lerch, 1981). Daun sirih merah mengandung minyak atsiri yang pada umumnya terdiri dari senyawa fenol, yaitu kavikol dan kavibetol (Prahastuti dan Tambunan, 2004). Sirih merah mengandung senyawa fenol sehingga memungkinkan untuk terjadinya pencoklatan. Pencoklatan pada eksplan dan kalus sirih merah dalam penelitian iniditanggulangi dengan melakukan perendaman asam sitrat 300 ppm selama 30 menit sebelum eksplan diinokulasikan ke dalam medium. Hal ini berdasarkan penelitian perbanyak benih klonal nangka secara *in vitro* yang dilakukan oleh Sunyoto dan Sadwiyanti (2002) yang memberikan perlakuan antioksidan dengan perendaman eksplan menggunakan larutan PVP, Asam Sitrat, dan Asam askorbat (100, 200, 300 ppm) selama 30 menit. Hasil terbaik diperoleh pada

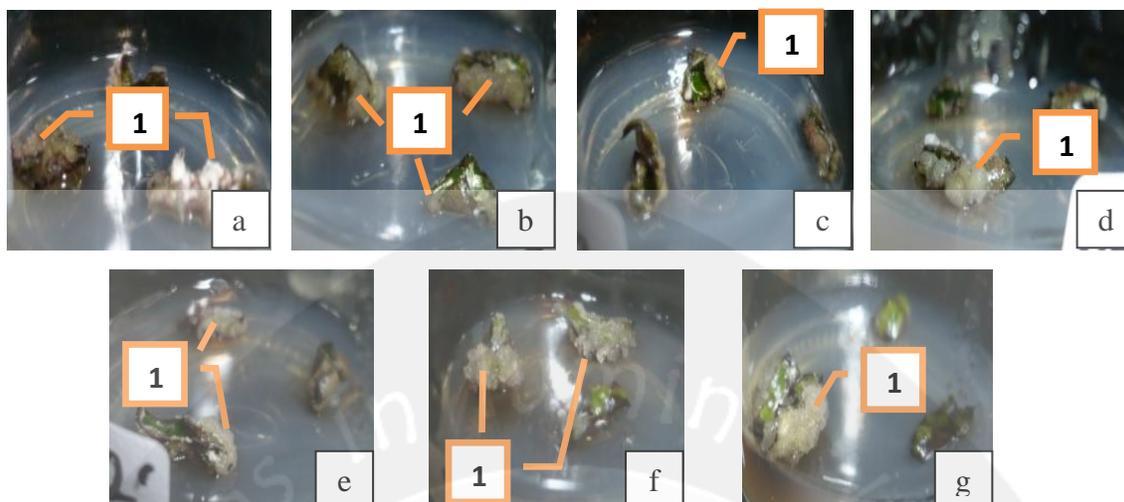
perlakuan PVP, Asam sitrat, dan asam askorbat dengan masing-masing konsentrasi 300 ppm dari intensitas pencoklatan pada nodus.

Pertumbuhan dan morfogenesis *in vitro* dipengaruhi oleh adanya interaksi dan perimbangan antara zat pengatur tumbuh yang ditambahkan dalam media dan hormon pertumbuhan yang diproduksi oleh sel tanaman secara endogen oleh sel-sel yang dikultur (Geroge dan Sherrington, 1984). Penambahan auksin dan sitokinin eksogen ini mengubah konsentrasi zat pengatur tumbuh endogen sel (Budiyati, 2002). ZPT bertindak secara sinergis dalam tindakannya sebagai penyebab respons (Gardner dkk., 1991). Efektifitas zat pengatur tumbuh auksin maupun sitokinin eksogen bergantung pada konsentrasi hormon endogen dalam jaringan tanaman. Kebanyakan hormon endogen di tanaman berada pada jaringan meristem yaitu jaringan yang aktif tumbuh seperti ujung-ujung tunas dan akar (Syahid dan Natalini, 2007). Golongan ZPT yang sangat penting dalam kultur jaringan ada 2, yaitu auksin dan sitokinin. ZPT tersebut mempengaruhi pertumbuhan dan morfogenesis dalam kultur sel, kultur jaringan, dan kultur organ (Karjadi 1996). Morfologi kalus yang terbentuk pada semua perlakuan secara umum menunjukkan karakteristik yang sama yaitu remah, dan cenderung berwarna putih-bening kehijauan-kekuningan (Tabel 4).

Tabel 4. Morfologi Kalus Sirih Merah Berdasarkan Perlakuan ZPT Pada Minggu Ke-6

Konsentrasi ZPT		Tipe Kenampakan
Kontrol	(A)	Remah, warna putih, bening kehijauan hingga bening kekuningan
2,4-D	0,5 mg/L (B)	
	1 mg/L (C)	
NAA	0,5 mg/L (D)	
	1 mg/L (E)	
IAA	0,5 mg/L (F)	
	1 mg/L (G)	

Hasil yang diperoleh menunjukkan kalus yang baru mulai muncul warnanya putih namun lama-lama warna kalus berubah menjadi bening hijau muda bening pada saat umur kalus memasuki akhir minggu kelima (Gambar 5).



Gambar 5. Morfologi kalus Sirih Merah berumur 4 Minggu

Keterangan: a = eksplan daun (kontrol); b = eksplan daun, medium $\frac{1}{2}$ MS + 2,4-D 0,5 mg/L; c = eksplan daun, medium $\frac{1}{2}$ MS + 2,4-D 1 mg/L; d = eksplan daun, medium $\frac{1}{2}$ MS + NAA 0,5 mg/L; e = eksplan daun, medium $\frac{1}{2}$ MS + NAA 1 mg/L; f = eksplan daun, medium $\frac{1}{2}$ MS + IAA 0,5 mg/L; g = eksplan daun, medium $\frac{1}{2}$ MS + IAA 1 mg/L; 1 = kalus remah, berwarna putih, bening kehijauan hingga bening kekuningan.

E. Total Kandungan Eugenol Kalus Sirih Merah

Kalus yang telah terbentuk diuji menggunakan kromatografi gas di Lembaga Penelitian dan Pengujian Terpadu Universitas Gadjah Mada (LPPT UGM). Uji eugenol dilakukan terhadap daun sirih dari tanaman yang sama dengan eksplan sumber kalus, kontrol, dan tiap perlakuan. Hasil perlakuan variasi konsentrasi hormon auksin terhadap kadar eugenol dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Hasil Perlakuan Variasi Konsentrasi ZPT Terhadap Kadar Eugenol (ppm per gram berat basah kalus)

Daun Sirih Merah	Kontrol	Auksin					
		2,4-D		NAA		IAA	
	(A)	0,5 (B)	1 (C)	0,5 (D)	1 (E)	0,5 (F)	1 (G)
<0,3500	6,0345	0,6218	0,9801	<0,3500	1,3500	0,7719	1,1431

Perlakuan A memperoleh kandungan eugenol tertinggi. Menurut Wattimena (1991), Sitokinin berperan dalam metabolisme asam nukleat dan sintesis protein. Perubahan metabolisme tersebut pada daerah tempat diberikannya sitokinin akan menyebabkan terjadinya penimbunan asam-asam amino, fosfat, gula dan bahan-bahan lain. Hal tersebut memungkinkan sel optimal menghasilkan metabolit sekunder

dibandingkan perkembangan bobot kalus, sedangkan perlakuan lain memperoleh kandungan eugenol lebih rendah, padahal sudah ditambahkan auksin bersama sitokinin untuk memacu penghasilan eugenol. Hal ini dimungkinkan sel-sel yang membangun kalus mempunyai fase pertumbuhan yang tidak seragam, menyebabkan aktivitas protein di dalam setiap sel juga berbeda yang dapat mengurangi jumlah senyawa yang dihasilkan dan jumlah enzim yang berperan dalam sintesis eugenol lebih sedikit.

Uji korelasi kandungan eugenol dan berat basah kalus menggunakan SPSS versi 19 menunjukkan tidak ada korelasi yang signifikan karena nilai signifikan $>0,05$ yaitu 0.6. Hal ini selaras dengan penelitian Trimulyono dkk., (2004) Kandungan minyak atsiri yang diperoleh dari kalus Nilam ternyata memiliki korelasi yang negatif terhadap laju pertumbuhan dan berat kering kalus. Hal tersebut menunjukkan bahwa minyak atsiri tidak disintesis pada saat pertumbuhan memasuki fase eksponensial, pada fase ini terjadi peningkatan laju pertumbuhan yang diikuti produksi biomassa. Hal ini menunjukkan bahwa sintesis minyak atsiri tidak berhubungan dengan produksi biomassa.

Dodds dan Robert (1983) dalam Rahmawati (1999), menyatakan bahwa sebelum inisiasi kultur jaringan terjadi tiga fase: fase log (fase penyesuaian), fase eksponensial (fase pembelahan sel, kecepatan pertumbuhan sel mencapai maksimum), fase stasioner (fase dimana tidak ada lagi pertumbuhan) Pada fase stasioner pertumbuhan sel terhenti dan selama inilah terjadi produksi metabolit sekunder. Fase pertumbuhan (eksponensial) biosintesis metabolit sekunder amat lambat bahkan seringkali belum dimulai.

Uji korelasi kandungan eugenol dan berat basah kalus menunjukkan tidak ada korelasi yang signifikan. Hal ini menunjukkan bahwa hasil berat basah kalus yang tinggi tidak diikuti oleh kandungan eugenol yang tinggi pula. Senyawa eugenol tidak disintesis bersamaan pada saat pertumbuhan memasuki fase eksponensial, pada fase ini terjadi peningkatan laju pertumbuhan yang hanya diikuti oleh produksi biomassa, dan dapat disimpulkan jika produksi eugenol tidak diikuti oleh produksi biomassa kalus.

Simpulan dan Saran

A. Simpulan

1. Kalus dari Sirih Merah dapat menghasilkan senyawa eugenol.

2. Penambahan auksin tidak terbukti mempercepat induksi kalus dan meningkatkan produksi senyawa eugenol kalus sirih merah.

B. Saran

1. Penelitian selanjutnya sebaiknya dilakukan juga variasi penambahan ZPT BA dalam medium $\frac{1}{2}$ MS pada eksplan daun Sirih Merah untuk melihat konsentrasi terbaik untuk induksi kalus dan produksi eugenol.
2. Penelitian selanjutnya sebaiknya dilakukan penambahan prekursor untuk memicu biosintesis eugenol.
3. Penelitian selanjutnya sebaiknya dilakukan kultur suspensi sel menggunakan konsentrasi BA yang optimal untuk produksi eugenol dalam skala yang lebih besar.

Daftar Pustaka

- Abidin, Z. 1990. *Dasar-Dasar Pengetahuan Tentang Zat Pengatur Tumbuh*. Penerbit Angkasa. Bandung.
- Bhaskaran, S. and R. H. Smith. 1990. Regeneration in cereal tissue culture. *A Review. Crop Science*. 30:1328-1336.
- Budiyati, R. 2002. Pertumbuhan Kalus Ibu Tangkai Daun Purwoceng (*Pimpinella alpine* Kds) dalam Medium MS (Murashige dan Skoog) dengan Pemberian 2,4-D dan BAP. *Skripsi*. Universitas Diponegoro. Semarang.
- Dodds, J.H. and L. R. Roberts. 1982. *Experiments in Plants Tissue Culture*. Cambridge University Press. Cambridge.
- Gardner, E. P, R. G. Pearce and R. L. Mitchel. 1991. *Physiology of Crop Plants*. Terjemahan: H. Susilo. University Indonesian Press. Jakarta.
- George, E. F. dan P. Sherrington. 1984. *Plant propagation by tissue culture. Handbook and Directory of Comereial Laboratories*. Eastern Press, Reading, Berks. England.
- Karjadi, A. K. 1996. *Perbaikan Sistem Pembibitan Kentang melalui Teknik Kultur Jaringan dan Teknik Perbanyakan Cepat*. Balai Penelitian Sayuran, Badan Litbang Departemen Pertanian. Bandung.
- Lakitan, B. 1996. *Fisiologi Pertumbuhan dan Perkembangan Tanaman*. PT. Raja Grafindo Persada, Jakarta.
- Litz, R. E., P. A. Moon, and V. M. Chavez. 1995. Somatic Embryogenesis from Leaf Callus Derived from Mature Trees of The Cycad *Ceratozamia hildae* (Gymnospermae). *Plant Cell*. 40:25-31.
- Lerch, K. 1981. Tyrosinase Kinetics: A semi-quantitative Model of Mechanism of Oxidation of Monohydric and Dihydric Phenolic Substrates. In Hutami, S. *Ulasan Masalah Pencoklatan paa Kultur Jaringan. AgroBiogen*. 4(2):83-88.
- Prahastuti S, dan K. Tambunan. 2004. *Tinjauan literatur sirih*. Pusat Dokumentasi dan Informasi Ilmiah (PDII). Jakarta.

- Rahmawati, E .S. 1999. Variasi Kadar KaliumDihidrogenafosfat dalam Medium MS terhadap SintesisMinyak Atsiri pada Tunas Hasil Kultur In Vitro DaunNilam Aceh(*Pogostemon cablin*(Blanco)Bth.). *Skripsi*. Fakultas Biologi UGM. Yogyakarta.
- Sandra, E. dan I. Karyaningsih. 2000. *Panduan Teknis Pelatihan Kultur Jaringan. Unit Kultur Jaringan Laboratorium Konservasi Tumbuhan Jurusan Konservasi Sumberdaya hutan Fakultas Kehutanan IPB*. PAU-IPB. Bogor.
- Santoso, U. dan F. Nursandi. 2001. *Kultur Jaringan Tanaman*. Universitas Muhammadiyah Malang Press. Malang.
- Sunyoto, dan L. Sadwiyanti. 2002. Perbanyak Benih Klonal Nangka Secara *In Vitro*. *Stigma*. 9(3):228-232.
- Syahid, S. F. and N. K. Natalini. 2007. Induksi dan Regenerasi Kalus KeladiTikus (*Typonium flagelliforme* Lodd.) secara In Vitro. *Jurnal Littri*.13:142-146.
- Trimulyono, G., Solichatun, S. D. Marlina. 2004. Pertumbuhan Kalus dan Kandungan Minyak Atsiri Nilam (*Pogostemon cablin* (Blanco) Bth.) dengan perlakuan Asam α -Naftalen Asetat (NAA) dan Kinetin. *Biofarmasi*. 2(1):9-14.
- Wattimena, G. A. 1991. *Zat Pengatur Tumbuh Tanaman*. PAU-IPB. Bogor.
- Wattimena, G. A., L. W. Gunawan, N. A. Mattjik, E. Syamsudin, N. M. A. Wiendi, dan A. Ernawati, 1992. *Bioteknologi Tanaman*. PAU Bioteknologi IPB. Bogor.
- Winarto, W. P. 2007. *Tanaman Obat Indonesia untuk Pengobat Herbal Jilid 2*. PT.Karyasari Herba Media. Jakarta.