

PENGARUH JENIS MEDIA DENGAN HORMON TUMBUH NAA-BAP TERHADAP PERTUMBUHAN DAN KANDUNGAN FLAVONOID KALUS DAUN *Echinaceae purpurea* (L.) Moench

Guntur Satrio Pratomo

¹Dosen Pengajar Program Studi D-III Farmasi, Fakultas Ilmu Kesehatan,
Universitas Muhammadiyah Palangkaraya

e-mail : guntursatrioprato@yahoo.com

ABSTRAK

Echinaceae purpurea (L.) Moench merupakan tanaman obat yang mempunyai khasiat salah satunya imunomodulator dan imunostimulan. Tanaman ini mengandung metabolit sekunder salah satunya yaitu flavonoid.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan media dalam menginduksi kalus dan mempengaruhi kandungan flavonoid dalam kalus daun *E.purpurea* (L.) Moench.

Eksplan adalah daun *E.purpurea* (L.) Moench yang segar, sehat, dan tidak terlalu tua. Sterilisasi eksplan dilakukan dengan Dithane M-45 2 %, dengan penambahan Tween 80, Agrept 20/WP 2 % dengan penambahan Tween 80, alkohol 70 %, dan Bayclin® 10 %. Penanaman eksplan dilakukan dengan menggunakan media MS, ½ MS, dan Gamborg dengan penambahan kombinasi zat pengatur tumbuh NAA dan BAP masing-masing konsentrasi 1 ppm. Evaluasi kalus dilakukan terhadap prosentase keberhasilan pembentukan, waktu induksi, dan rata-rata berat kalus. Analisa flavonoid dalam kalus dilakukan secara kualitatif dengan reaksi warna, tes Wilstater Cyanidin, Kromatografi kertas, dan Kromatografi Lapis Tipis, serta semikuantitatif dengan KLT-Densitometri

Hasil penelitian menunjukkan bahwa jenis media mempengaruhi keberhasilan pertumbuhan kalus dan kandungan flavonoid kalus daun *E.purpurea* (L.) Moench. Media Gamborg berpengaruh paling baik dalam menginduksi kalus sedangkan media ½ MS berpengaruh paling baik terhadap kandungan flavonoid di banding jenis media lain.

Kata Kunci: Flavonoid, *E.purpurea* (L.) Moench, Media MS, Media ½ MS, Media Gamborg, Hormon NAA dan BAP

PENDAHULUAN

Indonesia kaya akan obat yang berasal dari tanaman obat. Penggunaan tanaman obat cenderung meningkat seiring berkembangnya industri jamu, farmasi, kosmetik, dan makanan. Tanaman obat dalam pembudidayaannya ada beberapa tahap yang harus dilakukan. Setiap tahap memiliki ciri dan perhatian khusus diantaranya lingkungan tumbuh merupakan faktor yang cukup penting karena

berhubungan dengan produksi tanaman dan sifat genetiknya.

Metode Kultur Jaringan Tanaman adalah suatu metode yang banyak dipakai untuk memproduksi tanaman dan atau metabolit sekunder tanaman dengan waktu relatif singkat dan mudah yang memiliki sifat fisiologi dan morfologi yang sama persis dengan tanaman induknya dengan cara meletakkan suatu sel atau jaringan tanaman yang disebut eksplan secara aseptik dan

dipelihara dalam suatu media baik media padat maupun cair yang cocok dalam keadaan steril. (Hendaryono & Wijayani 1994)

Keberhasilan dalam budidaya tanaman secara kultur jaringan berkaitan dengan media tempat tumbuh tanaman tersebut, maka dari itu media memegang peranan penting dalam proses pertumbuhan tanaman, karena media merupakan tempat bagi jaringan untuk tumbuh dan mengambil nutrisi untuk keberlangsungan kehidupan jaringan. Media menyediakan berbagai bahan yang di perlukan jaringan untuk hidup, tidak hanya unsur hara, makro dan mikro, tetapi juga karbohidrat yang pada umumnya berupa gula untuk menggantikan carbon yang biasanya di peroleh dari proses fotosintetis. Beberapa media yang banyak di gunakan antara lain media Murashige Skoog (MS), media Gamborg, media White, dan media N6. Selain itu media juga harus di lengkapi dengan hormon tumbuh karena media tanpa hormon tumbuh menyebabkan pertumbuhan eksplan menjadi terhambat atau bahkan tidak tumbuh sama sekali. Hormon tumbuh yang efektif pada kultur jaringan untuk pertumbuhan kalus yakni kombinasi antara auksin dan sitokinin karena hormon auksin berguna untuk merangsang perpanjangan sel dan pembentukan kalus sedangkan sitokinin berguna untuk merangsang pembelahan sel., hormon auksin yang sering di gunkan adalah

Napthalene Acetic Acid (NAA) dan hormon sitokinin yang sring digunakan adalah Benzyl Amino Purin (BAP). Penelitian terhadap komposisi hormon tumbuh kombinasi auksin sitokinin terhadap pertumbuhan kalus sudah pernah di lakukan dan memberikan hasil kombinasi terbaik terhadap pembentukan kalus sebesar 1 mg/ L.. (Candra 2005)

Tanaman *E.purpurea (L.) Moench* merupakan tanaman yang paling banyak dikembangkan karena terkenal berfungsi pada sistem kekebalan tubuh (Hobbs 1994). Tanaman *E.purpurea (L.) Moench* mulai diteliti di Indonesia pada tahun 1998. Tanaman *E.purpurea (L.) Moench* memiliki kandungan kimia seperti polisakrida, flavonoid, turunan caffeic acid, serta minyak essensial. Tanaman ini dapat mengobati luka akibat gigitan ular, flu, sakit gigi, nyeri, herpes, dan dipakai dalam pengobatan kanker.

Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh penggunaan media yaitu media Murashige Skoog (MS), ½ MS, Gamborg, dengan penambahan hormon tumbuh NAA-BAP dengan konsentrasi 1ppm, terhadap keberhasilan pembentukan kalus, waktu induksi kalus, berat kalus, dan mengidentifikasi kandungan flavonoid pada kalus eksplan daun *E.purpurea (L.) Moench*.

METODE PENELITIAN

Bahan yang di gunakan adalah daun *E.purpurea* (L.) Moench yang bersal dari BP2TO-OT Tawangmangu Jawa Tengah, Media yang di gunakan yaitu media Murashige Skoog (MS), media $\frac{1}{2}$ MS, media Gamborg dengan penambahan hormon tumbuh NAA-BAP dengan konsentrasi 1 ppm, NaClO, Agrept, Dithane M-45, alkohol 70 %, Tween 80, aquadest steril, detergent. Bahan kimia untuk analisis falvonoid secara KLT yaitu asam asetat 15 % sebagai fase gerak, fase diamnya selulosa, kertas Whatman No. 1, bahan kimia untuk analisa kualitatif yakni HCL pekat, serbuk Mg, heksan, amil alkohol, alkohol, FeCl₃, AlCl₃, Amonia, Sitroborat

Alat yang di gunakan antara lain autoklaf, gelas ukur, erlenmeyer, botol kultur, cawan petri, aluminium foil, scalpel, pH stik, lampu UV 366 nm, pipa kapiler, oven, waterbath, bejana elusi, dan densitometer.

Pembuatan media

Bahan –bahan yang di perlukan untuk membuat media MS, $\frac{1}{2}$ MS, Gamborg, adalah dalam bentuk larutan stok (makro, mikro dan vitamin) kecuali agar-agar. Proses pembuatannya di mulai dari pemipetan larutan stok makro, mikro, vitamin, mioinositol, kemudian di tambahkan aquadest, lalu di tambahkan sukrosa 30 gram untuk media MS. 15 gram untuk media $\frac{1}{2}$ MS, 20 gram untuk media Gamborg, kemudian

tambahkan hormon tumbuh NAA-BAP dengan konsentrasi 1ppm, kemudian di ukur pHnya 5,0 – 6,0 , kemudian ditambahkan agar-agar kemudian diaduk dan dipnaskan di hot plate magnetik sterear, setelah tercampurkan homogen, kemudian di masukan ke dlam botol-botol kultur yang kemudian di tutup menggunakan aluminium foil kemudian dilanjutkan pada proses sterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121 C tekanan 1 atm selama 15 menit.

Sterilisasi

Sterilisasi alat dilakukan menggunakan autoklaf dengan suhu 121 C, tekanan 1 atm, selama 30 menit, tahapannya adalah semua alat yang akan di pakai, seperti pinset, scalpel, cawan petri, di bungkus dengan kertas lalu di masukkan ke dalam autoklaf untuk selanjutnya di sterilkan.

Sterilisasi eksplan dan penanaman

Daun *E.purpurea* (L.) Moench diambil dalam keadaan segar kemudian di potong bagian pinggirnya sehingga berbentuk persegi, kemudian di cuci menggunakan aquadest, kemudian direndam menggunakan larutan Dithane M-45 2% dengan penambahan 4 tetes tween 80 selama 10-15 menit, kemudian bilas menggunakan aquadest steril kemudia kembali direndam menggunakan Agrept 2% dengan menggunakan penamabhan 4 tetes Tween 80 selama 10-15 menit, bilas menggunakan aquadest steril, masukkan kembali ke dalrutan alkohol 70 % selama 0,5 menit lalu di

bia menggunakan aquadest steril, kemudian eksplan di bawa kedalam entkas atau ruang penanaman, didalam ruang penanaman ekplan kembali di rendam dengan larutan NaClO 10 % selama 10-15 menit kemudian di bilas menggunakan aquadest steril, barulah sampel siap untuk di lakukan penanaman pada botol kultur dengan cara daun *E.purpurea (L.) Moench* tersebut diletakan di cawan petri secara aseptik lalu di potong menggunakan scalpel menjadi ukuran 1 cm x 1 cm dengan bantuan pinset steril ekplan tersebut dimasukkan kedalam botol media kultur secara aseptik, pastikan sebagian besar bagian eksplan mengenai media lalu botol kultur tersebut di tutup menggunakan aluminium foil, semua alat yang di gunakan pada proses penanaman di ruang kultur harus selalu di fiksasi agar prosesnya aseptik, setelah penanaman selesai botol kultur di pelihara dalam ruang inkubasi dengan penerangan lampu TL berjarak 40-60 cm diatas permukaan botol dan suhunya di jaga berkisar antara 25-28 C.

Analisa Flavonoid

Kalus esplan daun *E.purpurea (L.) Moench* yang sudah dipanen kemudian di maserasi menggunakan pelarut metanol : air 9:1` selama 3 hari kemudian di pekatkan dengan cara diuapkan, kemudian di tambahkan pelarutnya 5 ml kemudian di maukkan kedalam labu takar. Ekstraksi juga

dilakukan terhadap tanaman asalnya sebagai pembandingan.

Analisa kualitatifnya meliputi reaksi warna dengan $FeCl_3$ yang akan menghasilkan warna yang bila ditambahkan dengan $AlCl_3$, akan menimbulkan warna kuning, uji penegasan dengan tes Wilstater Cyanidin yang akan memberikan warna merah crimson dan megenta kadang-kadang hijau atau biru. Kromotografi kertas menggunakan kertas whatman No. 01, dengan fase gerak asam asetat 15 % yang kemudian dideteksi dengan sinar UV 366 nm yang kemudian di uapi dengan amonia lalu amati perubahan warna yang terjadi sebelum diuapi dan setelah diuapi kemudian dilakukan penghitungan nilai Rf. Pada KLT menggunakan fase diam sellosa dan fase gerak asam asetat 15 % kemudian di lihat pada UV 366 nm dan di hitung hRfnya, secara semi kuantitatif menggunakan densitometer untuk membandingkan luas area bercak yang di peroleh oleh kalus dan tanaman asal.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Prosentasi Keberhasilan Pembentukan Kalus

Media memang memegang peranan penting dalam proses terbentuknya kalus, hal terliat pada tabel 1 terlihat bahwa 3 jenis media yang digunakan yaitu media MS, $\frac{1}{2}$ MS, dan media Gamborg menghasilkan

presentasi yang berbeda. Pada penelitian ini prosentase pembentukan kalus daun *E.purpurea* (L.) Moench terbaik terjadi pada hormon $\frac{1}{2}$ MS.

Media	Jumlah replikasi	Jumlah eksplan yang membentuk kalus	Keberhasilan pembentukan kalus (%)
MS	30	20	66,67
$\frac{1}{2}$ MS	30	24	80
Gamborg	30	21	70

Waktu induksi kalus

Gejala pertumbuhan kalus terlihat dari mulai timbulnya tonjolan-tonjolan putih yang tidak teratur pada bekas irisan daun. Pengaruh jenis media dapat dilihat pada tabel 2.

Jenis media yang digunakan	Rata-rata waktu induksi kalus (hari)
MS	12,25 \pm 1,16
$\frac{1}{2}$ MS	16,5 \pm 1,18
Gamborg (B5)	10,24 \pm 1,18

Pada tabel tersebut terlihat jelas bahwa media Gamborg memberikan hasil waktu induksi kalus terbaik

Hasil Rata-rata bobot kalus

Rerata berat kalus diperoleh dari menimbang berat basah kalus di bagi berat kalus kering dibagi jumlah botol. Berat basah kalus lebih besar dari pada kalus kering karena terjadi penguapan air pada kalus kering. Rerata bobot kalus tiap media dapat dilihat pada tabel 3.

Media	Jumlah botol	Rata-rata berat kalus basah (g)	Rata-rata berat kalus kering (g)
MS	20	0,520 \pm 0,22	0,051 \pm 0,02
$\frac{1}{2}$ MS	24	0,588 \pm 0,22	0,044 \pm 0,01
Gamborg	21	0,770 \pm 0,26	0,055 \pm 0,02

Dari hasil evaluasi kalus baik pada prosentase perbentukan kalus, waktu induksi kalus, dan rerata berat kalus,

memperlihatkan bahwa penanaman eksplan daun *E.purpurea* (L.) Moench pada jenis media yang berbeda-beda menghasilkan pertumbuhan yang tidak sama. Hal ini dikarenakan kandungan unsur hara dari masing-masing media berbeda. Berdasarkan hasil evaluasi kalus maka media Gamborg merupakan media yang paling bagus untuk menumbuhkan eksplan daun *E.purpurea* (L.) Moench

Analisis Flavonoid

Analisa senyawa flavonoid dalam tanaman asal dan kalus daun *E.purpurea* (L.) Moench dilakukan secara kualitatif yang meliputi uji reaksi warna, uji dengan tes Wilstater Cyanidine, Kromatografi kertas, dan Kromatografi Lapis Tipis

Dari hasil uji reaksi warna dan tes Wilstater Cyanidine pada kalus eksplan daun dan tanaman asal *E.purpurea* (L.) Moench memberikan interpretasi bahwa keduanya mengandung flavonoid, hasil terlihat pada tabel 4

Media	+ FeCl ₃	+ AlCl ₃	Test Wilstater Cyanidin	Interpretasi*
MS	Ungu	Kuning	Merah	Flavonoid
$\frac{1}{2}$ MS	Ungu	Kuning	Merah	Flavonoid
Gamborg	Ungu	Kuning	Merah	Flavonoid
TA	Ungu	Kuning	Merah	Flavonoid

Keterangan:

* = Berdasarkan K. R. Markham (1988)

Pada pengujian Kromatografi kertas yang menggunakan kertas Whatman No. 01 sebagai fase diam dan menggunakan fase gerak asam asetat 15 % menghasilkan warna kuning lemah pada UV 366 nm yang jika di uapi dengan amonia akan menjadi kuning dan kuning intensif bila di semprot

Pengaruh Jenis Media Dengan Hormon Tumbuh Naa-Bap Terhadap Pertumbuhan Dan Kandungan Flavonoid Kalus Daun *Echinaceae Purpurea (L.) Moench*

dengan sitroborat hal ini menunjukkan bahwa antara tanaman asli dan kalus eksplan daun *E.purpurea (L.) Moench* menghasilkan metabolit sekunder yang sama dan Kromatografi Lapis Tipis pada pengujian ini juga memberikan hasil noda bercak yang sama hal ini berarti antara teknik kultur jaringan akan menghasilkan metabolit yang sama dengan tanaman asalnya. Hasil pengujian Kromatografi kertas (tabel 5) dan Kromatografi Lapis Tipis (tabel 6) dapat dilihat pada tabel dibawah ini

Sampel	Bercak	hRf	Warna Bercak			Interpretasi*
			UV 366	Uap amonia	Sitroborat	
TA	1	25 70	Kuning lemah	Kuning	Kuning intensif	Flavonoid Flavonoid
	2		Kuning lemah	Kuning	Kuning intensif	
A	1	26 69	Kuning lemah	Kuning	Kuning intensif	Flavonoid Flavonoid
	2		Kuning lemah	Kuning	Kuning intensif	
B	1	26 70	Kuning lemah	Kuning	Kuning intensif	Flavonoid Flavonoid
	2		Kuning lemah	Kuning	Kuning intensif	
C	1	28 69	Kuning lemah	Kuning	Kuning intensif	Flavonoid Flavonoid
	2		Kuning lemah	Kuning	Kuning intensif	

Keterangan :

TA = Tanaman asal

A = Ekstrak kalus daun *E. purpurea (L.) Moench* pada media MS dengan penambahan hormon kombinasi NAA-BAP konsentrasi 1 ppm : 1ppm

B = Ekstrak kalus daun *E. purpurea (L.) Moench* pada media ½ MS dengan penambahan hormon kombinasi NAA-BAP konsentrasi 1 ppm : 1ppm

C = Ekstrak kalus daun *E. purpurea (L.) Moench* pada media Gamborg dengan hormon kombinasi NAA-BAP konsentrasi 1 ppm : 1ppm

Sampel	Bercak	hRf	Warna bercak			Interpretasi*
			UV 366	Uap amonia	Sitroborat	
TA	1	27 73	Kuning	Kuning terang	Kuning	Flavonoid Flavonoid
	2		Kuning	Kuning terang	Kuning	
A	1	26 67	Kuning	Kuning terang	Kuning	Flavonoid Flavonoid
	2		Kuning	Kuning terang	Kuning	
B	1	27 70	Kuning	Kuning terang	Kuning	Flavonoid Flavonoid
	2		Kuning	Kuning terang	Kuning	
C	1	27 70	Kuning	Kuning terang	Kuning	Flavonoid Flavonoid
	2		Kuning	Kuning terang	Kuning	

Keterangan:

* = Berdasarkan buku Cara Mengidentifikasi Flavonoid, K. R. Markham (1988)

A = Ekstrak kalus daun *E. purpurea (L.) Moench* pada media MS dengan penambahan hormon kombinasi NAA-BAP konsentrasi 1 ppm : 1ppm

B = Ekstrak kalus daun *E. purpurea (L.) Moench* pada media ½ MS dengan penambahan hormon kombinasi NAA-BAP konsentrasi 1 ppm : 1ppm

C = Ekstrak kalus daun *E. purpurea (L.) Moench* pada media Gamborg dengan hormon kombinasi NAA-BAP konsentrasi 1 ppm : 1ppm

TA = Tanaman asal

Hasil pengujian KLT Densitometri pada kalus eksplan daun *E.purpurea (L.) Moench* di setiap jenis media menunjukkan luas area yang berbeda-beda, hal ini berarti besarnya kandungan flavonoid pada masing-masing media berbeda semakin luas areanya maka, semakin besar kadar flavonoidnya, hasil luas area terbesar di tunjukkan oleh media ½ MS berarti kalus yang di hasilkan pada eksplan dengan media ½ MS memiliki kandungan flavonoid yang lebih besar dibanding media yang lain.

Hasil Pengukuran luas area menggunakan Densitometri dapat dilihat pada tabel 7 di bawah ini

Sampel	Bercak	Berat kalus kering yang dibuat ekstrak	Luas area	Perbandingan luas area bercak antara kalus dengan tanaman asal	
				Sampel	Angka
TA	1	1,011	49408,03 238206,4	-	-
	2				
A	1	1,022	37325,89 180860,0	TA : A	1:0,74 1:0,75
	2				
B	1	1,025	59486,99 185889,6	TA : B	1:1,18 1:0,76
	2				
C	1	1,011	49192,34 144719,8	TA : C	1:0,99 1:0,60
	2				

Keterangan:

A = Ekstrak kalus daun *E. purpurea (L.) Moench* pada media MS dengan penambahan hormon kombinasi NAA-BAP konsentrasi 1 ppm : 1ppm

B = Ekstrak kalus daun *E. purpurea (L.) Moench* pada media ½ MS dengan penambahan hormon kombinasi NAA-BAP konsentrasi 1 ppm : 1ppm

C = Ekstrak kalus daun *E. purpurea (L.) Moench* pada media Gamborg dengan hormon kombinasi NAA-BAP konsentrasi 1 ppm : 1ppm

TA = Tanaman asal

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan

- a. Pemakaian media Murashige Skoog, $\frac{1}{2}$ Murashige Skoog, dan Gamborg dengan penambahan hormon tumbuh NAA-BAP dengan konsentrasi masing-masing 1 ppm dapat mempengaruhi keberhasilan pembentukan kalus dari eksplan daun tanaman *E.purpurea* (L.) Moench, waktu induksi kalus, dan rata-rata berat kalus daun *E.purpurea* (L.) Moench. Media yang paling baik dalam menginduksi kalus adalah media Gamborg dengan waktu induksi 10.24 hari.
- b. Pemakaian media Murashige Skoog, $\frac{1}{2}$ Murashige Skoog, dan Gamborg dengan penambahan hormon tumbuh NAA-BAP dengan konsentrasi masing-masing 1 ppm dapat mempengaruhi kandungan flavonoid pada kalus daun tanaman *E.purpurea* (L.) Moench. Dengan kandungan flavonoid tertinggi ada pada media $\frac{1}{2}$ MS

DAFTAR PUSTAKA

1. Candra RA. 2005. Pengaruh Penambahan Hormon NAA dan BAP dalam Media MS terhadap Kandungan Senyawa Flavonoid dalam Daun *E. purpurea* (L.) Moench [Skripsi]. Surakarta: Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi. hlm 45-49
2. Harbone, J.B. 1987. *Metode Fitokimia*, diterjemahkan oleh Padmawinata, K., Soediro, I, Penerbit ITB, Bandung, 13, 71-74.
3. Hendaryono, D.P.S., Wijayani, A. 1994. *Teknik Kultur Jaringan*, Kanisius, Yogyakarta. hlm 28-29, 59-62, 89
4. Hobbs, C., 1994. *Echinacea the Immune Herbs*, Botanica Press, Capitola, CA, 39.
5. Markham, K. 1988. *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*, diterjemahkan Kosasih Padmawinata, Penerbit ITB, Bandung, 1, 10, 15, 32.