



Induksi Kalus Dan Metabolit Sekunder Tanaman Brotowali (*Tinospora crispa* L.) Pada Medium MS Dengan Penambahan ZPT 2,4-D dan Air Kelapa Secara In Vitro

Induction Of Callus And Metabolite Secondary Brotowali (*Tinospora crispa* L.) ON MS Medium Addition of 2,4-D ZPT and Coconut Water by In Vitro

Dewi Sukmawati^{1*}, Herlina¹, Muslimin², I Nengah Suwastika¹

¹Lab. Bioteknologi Jurusan Biologi Fakultas MIPA, Universitas Tadulako, Palu 94111 Indonesia

²Lab. Ilmu-Ilmu Kehutanan, Fakultas Kehutanan, Universitas Tadulako, Palu 94111 Indonesia

ABSTRACT

This study to know influence of the addition of coconut water on to MS medium with combination to 2,4-D in encouraging callus growth and metabolite secondary production on Brotowali (*Tinospora crispa* L.) in vitro. This research was arranged based on completely randomized design (CRD) with 5 treatments and 5 replications, medium used was MS in combination to 10% coconut water and 2,4-Diklorofenoksiasetat in different concentration 2,0 mg/L, 2,5 mg/L, 3,0 mg/L, 3,5 mg/L, dan 4,0 mg/L. Observed parameters were consisting of time the emergence of callus after induction, the percentage of explant forming a callus, callus weight, callus color, callus texture and metabolite secondary production. Treatment M3 (M₃ : MS₀ + coconut water 10% + 3,0 mg/L 2,4-D) on the parameters of callus weight showed a significant effect of the treatment. Callus color produced is brownish (Browning), has an intermediate texture and callus capable of producing flavonoids.

Keywords: *Tinospora crispa* L. secondary metabolite, callus, coconut water, flavonoid.

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penambahan air kelapa pada medium MS dengan kombinasi 2,4-D dalam mendorong pertumbuhan kalus dan produksi metabolit sekunder pada tanaman Brotowali (*Tinospora crispa* L.) secara *in vitro*. Penelitian ini disusun berdasarkan pada Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 5 perlakuan dan 5 ulangan, media perlakuan yang digunakan adalah air kelapa 10% dan 2,4 Diklorofenoksiasetat (2,4-D) dengan konsentrasi berbeda yaitu 2,0 mg/L, 2,5 mg/L, 3,0 mg/L, 3,5 mg/L, dan 4,0 mg/L. Parameter pengamatan terdiri dari waktu munculnya kalus, persentase eksplan yang membentuk kalus, berat kalus, warna kalus, tekstur kalus dan produksi metabolit sekunder. Perlakuan M3 (MS₀+ Air kelapa 10% + 3,0 mg/L) pada parameter berat kalus menunjukkan pengaruh yang nyata dari perlakuan. Warna kalus yang dihasilkan adalah kecoklatan (Browning), memiliki tekstur intermediet dan kalus mampu menghasilkan Flavonoid.

Kata Kunci : Brotowali, *Tinospora crispa* L., kalus, Air Kelapa, Flavonoid, Metabolit sekunder

LATAR BELAKANG

Brotowali (*Tinospora crispa* L.) adalah tanaman perdu dan memanjat termasuk dalam family Menispermaceae. Tanaman Brotowali merupakan tanaman yang sering digunakan masyarakat sebagai obat tradisional. Tanaman ini dikenal dapat mengatasi rematik artiristik, rematik sendi pinggul (Sciatica), demam, merangsang nafsu makan, kencing manis, dan malaria. Hal tersebut dikarenakan banyaknya senyawa metabolit sekunder yang terkandung pada tanaman ini, seperti Alkaloid, Damar Lunak, Pati, pikroretosid, Zat pahit pikroretin, Harsa, Berberin, Palmatin dan Kolumbin (Umi and Noor *et al.*, 1995). Dengan berbagai kandungan yang ada pada tanaman Brotowali tersebut sehingga tanaman ini perlu dilakukan budidaya untuk meningkatkan produksi metabolit sekunder melalui teknik Bioteknologi.

Bioteknologi termasuk dalam teknik kultur jaringan yang sering dimanfaatkan untuk pemilihan, pengandaan, peningkatan dan menganalisis tanaman obat. Pada sistem kultur jaringan menghasilkan metabolit sekunder yang berguna sebagai bahan obat-obatan yang berguna bagi masyarakat. Produksi metabolit sekunder telah mengalami kemajuan yang pesat. Salah satu aspek yang semakin berkembang adalah proses produksi metabolit sekunder melalui kultur

jaringan tanaman (Santoso dan Nursandi, 2003).

Kultur jaringan adalah suatu metode perbanyakan tanaman yang dilakukan secara *in vitro*. Perbanyakan tanaman dengan teknik kultur jaringan merupakan alternatif untuk mendapatkan tanaman yang sehat dan mutu bibit dan sel lebih terjamin, kecepatan tumbuh bibit lebih cepat dan mampu menghasilkan bibit dengan jumlah besar dalam waktu yang relatif singkat (Hendaryono dan wijayani, 1994).

Penelitian tanaman Brotowali masih sangat jarang dilakukan terutama pada tahap induksi kalus dan metabolit sekunder. Air kelapa merupakan senyawa organik yang sering digunakan dalam aplikasi teknik kultur jaringan. Hal ini disebabkan air kelapa mengandung 1,3 diphenilurea, zeatin, zeatin gluoksida, dan zeatin ribosida dan harganya yang murah (Armini *dkk.*, 1992). Air kelapa merupakan air alami steril mengandung kadar K dan Cl tinggi. Selain itu, air kelapa mengandung sukrosa, fruktosa, dan glukosa (Netty, 2002). Oleh karena itu, produksi metabolit sekunder pada tanaman Brotowali (*T. crispa* L.) kemungkinan juga dapat diinduksi dengan penambahan air kelapa melalui teknik kultur jaringan.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Ilmu-ilmu Kehutanan

Fakultas Kehutanan Universitas Tadulako dan Laboratorium Bioteknologi, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu batang tumbuhan Brotowali *T. crispa* L.

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan konsentrasi ZPT 2,4-D sebagai perlakuan.

P₁: MS₀ + 10% Air kelapa + 2,0 mg/L 2,4-D

P₂: MS₀ + 10% Air kelapa + 2,5 mg/L 2,4-D

P₃: MS₀ + 10% Air kelapa + 3,0 mg/L 2,4-D

P₄: MS₀ + 10% Air kelapa + 3,5 mg/L 2,4-D

P₅: MS₀ + 10% Air kelapa + 4,0 mg/L 2,4-D.

Setiap perlakuan dilakukan ulangan sebanyak 5 kali. Dalam satu botol kultur terdiri dari 3 eksplan. Parameter pengamatan yang diamati adalah: (1) waktu munculnya kalus, (2) Persentase eksplan yang membentuk kalus, (3) Berat kalus, (4) Warna kalus, (5) Tekstur kalus, dan (6) Produksi metabolit sekunder. Data kuantitatif yang diperoleh berdasarkan *one way* ANOVA (Analysis Of Varian) menggunakan program Microsoft Excel.

Analisis kualitatif flavonoid dapat dilakukan dengan menggunakan

spektrofotometer UV-VIS (Neldawati dkk., 2013). Sampel sebanyak 0,1 g diekstrak, kalus dimasukkan kedalam tabung reaksi ditambahkan 1,5 mL larutan etanol 95%. Campuran diinkubasi selama 30 menit. Absorbansi larutan ditentukan dengan menggunakan Spektrofotometer Ultra Violet Visible (UV-Vis) pada panjang gelombang 230 - 295 nm (Pita I) dan 300 – 560 (Pita II)

HASIL

Pengamatan saat muncul kalus

waktu munculnya kalus ditunjukkan dengan adanya tonjolan kecil pada eksplan yang berwarna putih yang semakin hari berubah menjadi warna kecoklatan (Browning). Rata-rata waktu muncul kalus pada eksplan secara lengkap disajikan pada Tabel 4.1. Semua perlakuan yang diberikan menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata.

Tabel 1. Waktu kuncunya Kalus dari hari setelah tanam (HST) tanaman Brotowali secara *in vitro*

Perlakuan	Ulangan					Total	Rata-rata (stdev)
	1	2	3	4	5		
M1	11	13	12	11	10	57	11.40 (0.51)
M2	13	12	15	10	11	61	12.20 (0.86)
M3	6	10	14	9	11	50	10.00 (1.30)
M4	6	8	11	10	8	43	8.60 (0.87)
M5	8	10	16	2	8	44	8.80 (2.24)
Total	44	53	68	42	48	255	51,00

Keterangan : M₁ (MS₀ + 10% Air kelapa + 2,0 mg/L 2,4-D), M₂ (MS₀ + 10% Air kelapa + 2,5 mg/L 2,4-D), M₃ (MS₀ + 10% Air kelapa + 3,0mg/L 2,4-D), M₄ (MS₀ + 10% Air kelapa + 3,5 mg/L 2,4-D) dan M₅ (MS₀ + 10% Air kelapa + 4,0 mg/L 2,4-D).

Persentase eksplan yang membentuk kalus

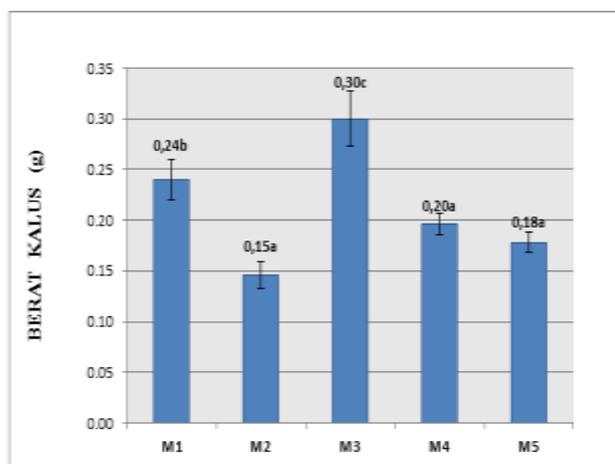
Data rata-rata persentase eksplan yang membentuk kalus disajikan pada Tabel 2. Semua perlakuan memberikan respon yang baik, mampu menginduksi kalus.

Tabel .2 Persentase eksplan yang membentuk kalus dari hari setelah tanam(HST) tanaman Brotowali secara *in vitro*

Perlakuan	Ulangan					Total	Rata-rata (stdev)	
	1	2	3	4	5			
M1	100	33	66	66	33	198	59.60	(12,5)
M2	100	66	66	33	66	231	66.20	(10,59)
M3	100	33	66	33	66	198	59.60	(12,51)
M4	100	33	66	100	33	232	66.40	(14,98)
M5	100	66	33	100	33	232	66.40	(14,98)
Total	500	231	297	332	231	1091	318.20	

Berat kalus

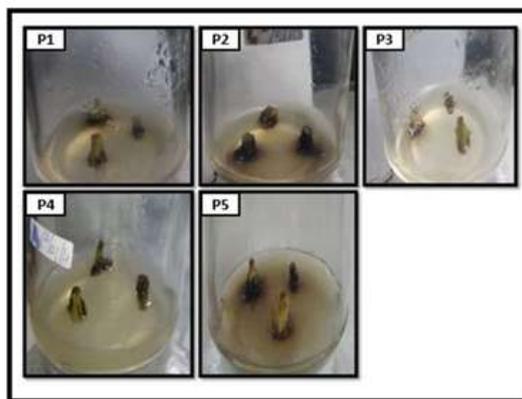
Berdasarkan berat kalus yang diperoleh yang paling baik yaitu pada perlakuan M3 (MS₀ + 10% Air kelapa + 3,0mg/L 2,4-D) dengan berat kalus 0,30g. Hasil ini lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan lain. Data rata-rata persentase eksplan yang membentuk kalus di sajikan pada gambar 1.



Gambar 1. Rata-rata berat kalus tanaman Brotowali secara *in vitro*

Warna Kalus

Kalus yang terbentuk secara keseluruhan berwarna coklat atau kalus mengalami Browning. Seperti tampak pada Gambar 2.



Gambar. 2. Morfologi kalus tanaman Brotowali pada hari terakhir pengamatan.

Tekstur Kalus

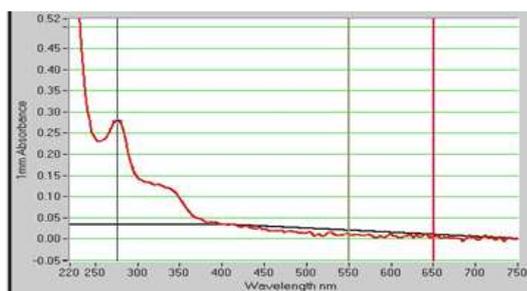
Tekstur kalus dari eksplan tanaman Brotowali ini bertipe intermediet. Pada penelitian tidak menghasilkan tekstur bertipe remah. Hal ini sesuai dengan yang dikemukakan oleh (Widyawati, 2010) bahwa terbentuknya kalus bertipe remah dipacu oleh adanya hormon auksin endogen yang diproduksi secara internal oleh eksplan yang dikultur. Data tekstur kalus tanaman Brotowali secara lengkap disajikan pada tabel 3.

Tabel 3. Tekstur kalus eksplan tanaman Brotowali pada medium MS dengan berbagai konsentrasi 2,4-D dan penambahan air kelapa

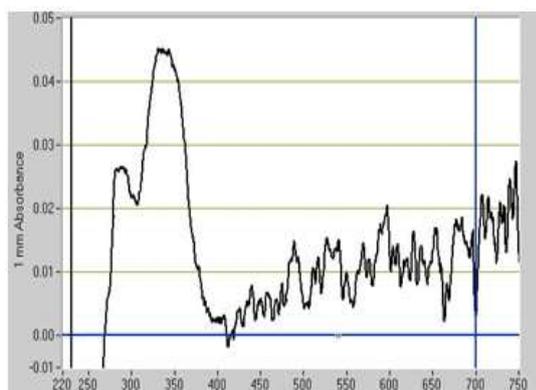
Perlakuan	Ulangan				
	1	2	3	4	5
M ₁	Intermedit	Intermedit	Intermedit	Intermedit	Intermedit
M ₂	Intermedit	intermedit	Intermedit	Intermedit	Intermedit
M ₃	Intermedit	Intermedit	Intermedit	Intermedit	Intermedit
M ₄	Intermedit	intermedit	Intermedit	Intermedit	Intermedit
M ₅	Intermedit	intermedit	Intermedit	Intermedit	Intermedit

Produksi metabolit sekunder

Pertumbuhan kalus yang baik pada perlakuan M₃ (MS₀ + 10% Air kelapa + 3,0mg/L 2,4-D), sehingga digunakan sebagai sample untuk menghasilkan metabolit sekunder. Gambar metabolit sekunder yang terdapat pada kalus.



Gambar 4. Metabolit sekunder pada kalus tanaman Brotowali



Gambar 5. Metabolit sekunder pada daun tanaman Brotowali



Gambar .6. Metabolit sekunder pada batang tanaman Brotowali

PEMBAHASAN

Kalus yang diperoleh pada perlakuan M₃ menghasilkan berat kalus tertinggi. Hanya saja kalus yg dihasilkan berwarna kecoklatan (Browning). Salah satu senyawa yang sering digunakan untuk menginduksi pembelahan sel atau menginduksi kalus adalah zat pengatur tumbuh 2,4-D (Wetter dan Constabel, 1991; Wattimena, 1992). Ini dapat dilihat dari respon pada eksplan, pada rata-rata saat munculnya kalus yaitu pada minggu ke-2. Dalam jumlah rendah zat pengatur tumbuh 2,4-D mampu menginduksi kalus tanaman Brotowali.

Berdasarkan hasil saat munculnya kalus semua perlakuan mempunyai respon yang sama yaitu dapat memunculkan kalus. Hal ini sesuai dengan pernyataan flavonoid Bektikkk., 2003, bahwa .Penambahan 2,4-D dalam media kultur akan merangsang pembelahan dan pembesaran sel pada eksplan sehingga dapat memacu pembentukan dan pertumbuhan kalus serta meningkatkan senyawa kimia.

Kalus yang diperoleh adalah bertipe intermediet dimana kalus lengket dan padat. Pada perlakuan yang dicobakan ini tidak dapat menghasilkan tekstur bertipe remah, hal tersebut bisa dikarenakan kurangnya hormon auksin endogen yang diproduksi oleh eksplan tanaman Brotowali yang di kultur. Hal ini sesuai dengan yang dikemukakan oleh (Widyawati, 2010) bahwa terbentuknya kalus bertipe remah

dipacu oleh adanya hormon auksin endogen yang diproduksi secara internal oleh eksplan yang dikultur.

Metabolit sekunder terdiri atas beberapa macam seperti alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, golongan terpenoid dan golongan glukosida. penelitian ini dilakukan pengukuran metabolit sekunder jenis flavonoid. Pengukuran kalus menggunakan spektrofotometer UV-VIS terdapat flavonoid pada panjang gelombang 250-350 nm. Selanjutnya pada pengukuran daun dan batang Brotowali juga dilakukan pengukuran dengan menggunakan spektrofotometer UV-VIS, hasil yang didapat pada batang dan kalus dari tanaman Brotowali sama-sama terdapat flavonoid pada panjang gelombang 250-350 nm dengan jenis flavonol. Sedangkan pada pengukuran daun sedikit berbeda dari hasil kalus dan batang. Pada daun terdapat pada panjang gelombang 260-300 nm dan 300-350 nm.

DAFTAR PUSTAKA

- Armini, N. M., Wattimena G. A., dan L, W, Gunawan. (1991). Bioteknologi Tanaman. Pusat Antar Universitas. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Bekti, R., Solochatun, E., Anggarwulan. (2003). Pengaruh asam 2,4-diklorofenoksiasetat (2,4-D) terhadap pembentukan dan pertumbuhan kalus serta kandungan flavonoid kultur kalus *Acalypha indica* L. *Biofarmasi*. Vol. 1, No. 1, ISSN: 1693-2242.
- Hendaryono, D. P. S., dan Wijayani, A.(1994). Teknik Kultur Jaringan, Yogyakarta.
- Neldawati, Ratnawulan dan Gusnedi. 2013. Analisis nilai absorbansi dalam penentuan kadar flavonoid untuk berbagai jenis daun tanaman obat. *J. Pillar of physics* 2:76-83.
- Netty, W. (2002). Optimasi Medium Untuk Multiplikasi Tunas Kana (*Cannabryda* Hort.) Dengan Penambahan Sitokinin, *Jurnal Biosains dan Bioteknologi Indonesia*, 2(1):27-31.
- Santoso, U., Nursandi, F.(2003). Kultur Jaringan Tanaman.Edisi I. UMM, Malang.
- Umi, K,Y., and Noor H. (1995). Flavone O-glycosides From *Tinospora crispa* L. *Fitoterapia* 66(3):280.
- Wattimena, G.A. (1992). Zat Pengatur Tumbuh Tanaman Pusat Antar Universitas Bioteknologi, Institut Petanian Bogor, Bogor.
- Wetter, L. R., and Constable, F.(1991).Metode Kultur Jaringan Tanaman.(diterjemahkan oleh Mathilda B Widiyanto). Edisi Kedua,.ITB, Bandung.
- Widyawati, G. (2010). Pengaruh Variasi Konsentrasi NAA dan BAP Terhadap Induksi Kalus Jarak Pagar, Tesis tidak diterbitkan, Surakarta: Universitas Sebelas Maret.