

PENINGKATAN PEMBENTUKAN KALUS *Rhynchosytilis retusa* MELALUI PERENDAMAN EKSPLAN DAUN DALAM VITAMIN C DAN PENAMBAHAN ARANG AKTIF PADA MEDIA KULTUR *IN VITRO*

INCREASING *Rhynchosytilis retusa*'s CALLUS FORMATION THROUGH EXPLANT LEAVES IMMERSION IN ASCORBIC ACID AND ADDITION OF ACTIVATED CHARCOAL IN *IN VITRO* CULTURE MEDIA

Oleh: Dwi Kurniasari¹, Ixora Sartika Mercuriani²

¹Mahasiswa Jurusan Pendidikan Biologi UNY, ²Dosen Jurusan Pendidikan Biologi UNY

Jalan Colombo No. 1, Karangmalang, Caturtunggal, Depok, Sleman, Yogyakarta, Indonesia, 55281

e-mail: ¹ dwikurniasari12@gmail.com, ² Ixomerc@uny.ac.id

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk meningkatkan Pembentukan kalus *Rhynchosytilis retusa* melalui perendaman eksplan dengan vitamin C dan penambahan arang aktif pada media kultur *in vitro*. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen dengan 2 faktor yaitu perendaman eksplan dengan vitamin C (direndam dan tidak direndam), dan penambahan arang aktif (pro-analis/AA-PA dan komersial/AA-K). Sumber eksplan untuk induksi kalus adalah daun tanaman anggrek *R. retusa* yang berumur 18 bulan setelah tanam (bst) dalam kultur *in vitro*. Penelitian dilakukan selama 8 minggu dengan parameter yang diukur meliputi: tingkat *browning* pada eksplan, waktu munculnya kalus, persentase eksplan yang membentuk kalus dan ukuran kalus. Penambahan arang aktif baik pro-analis maupun komersial dalam media kultur *in vitro* terbukti mampu membentuk kalus. Kombinasi perlakuan perendaman vitamin C dan penambahan arang aktif pro-analis mampu membentuk kalus terbesar 0,293 mm.

Kata kunci: kalus, *Rhynchosytilis retusa*, vitamin c, arang aktif, *browning*, eksplan

Abstract

*The aimed of this research is to increasing callus formation through explants immersion in ascorbic acid and addition of activated charcoal on the tissue culture media to. It's an experimental research with two factors, i.e immersion explants in ascorbic acid (immersed and not immersed) and addition of activated charcoal (pro-analysis and commercial) on the tissue culture. Eighteen months after sowing (mas) *R. retusa* plants were use as explants. Callus growth were measured by observing browning level, time when a layer of transparent cell can observed, percentage of callus produced explants and callus size (thickness). The addition of activated charcoal (pro-analysis and commercial) on the tissue culture media could forming *R. retusa* callus formation. The combination of immersion treatment of ascorbic acid and the addition of pro-analysis activated charcoal was able to produces thicknes callus (0.293 mm).*

Keywords: callus, Rhynchosytilis retusa, ascorbic acid, activated charcoal, browning, explant

PENDAHULUAN

Lebih dari 30.000 spesies anggrek alam tersebar di dunia, sekitar 5000 spesies diantaranya terdapat di Indonesia (Irawati, 2002). Anggrek ekor tupai (*Rhynchosytilis retusa*) merupakan salah satu spesies yang tersebar luas di pulau Jawa. *Rhynchosytilis retusa* memiliki aroma bunga yang wangi serta bentuk dan warna yang

menarik. Anggrek tersebut juga memiliki potensi dalam kesehatan sebagai tanaman obat karena mempunyai kandungan metabolit sekundernya (Arjinal *dkk.*, 2016: 2). Keunggulan tersebut menyebabkan *R. retusa* mulai digemari oleh pengembang anggrek.

Perbanyakan anggrek dapat dilakukan secara vegetatif atau generatif baik melalui teknik konvensional maupun kultur *in vitro*.

Perbanyakkan secara vegetatif konvensional membutuhkan waktu yang lama dan jumlah anakan terbatas (Widiastoety & Marwoto, 2004: 1), sehingga untuk mendapatkan anakan dalam jumlah besar dan waktu yang singkat dapat dilakukan dengan kultur *in vitro*.

Perbanyakkan melalui kultur *in vitro* dapat dilakukan melalui kultur kalus yang akan menghasilkan anakan dengan keanekaragaman genetik relatif rendah (Purnamaningsih, 2002: 51). Kultur *in vitro* untuk tujuan perbanyakkan embrio somatik maupun produksi senyawa metabolit sekunder dapat dilakukan Melalui induksi kalus. Kalus menghasilkan metabolit sekunder lebih tinggi daripada yang berasal dari tanaman (Daisy & Wijaya, 1994: 120).

Induksi kalus pada anggrek sering menemui kendala, selain adanya kontaminasi juga terjadi *browning* pada eksplan. Kendala tersebut akan menurunkan kemampuan eksplan untuk tumbuh dan berkembang (Wulandari *dkk.*, 2014: 4). Menurut Admojo & Indriarto (2016: 26) tingkat *browning* pada fase induksi kalus masih tinggi. *Browning* disebabkan oleh senyawa fenol yang terakumulasi ketika eksplan dilukai. Tingkat *browning* pada jaringan muda umumnya lebih rendah dibandingkan dengan jaringan yang tua (George & Sherrington, 1984; Hutami, 2008: 83). *Browning* dapat diatasi dengan menambahkan antioksidan seperti vitamin C dan arang aktif.

Penggunaan arang aktif dengan konsentrasi 2 g.L^{-1} dapat menghilangkan efek negative oksidasi fenol pada pertumbuhan tanaman anggrek *Disa* spp. (Thomas, 2008: 626). Penelitian yang di lakukan oleh Ko *et al.* (2009: 137) menunjukkan bahwa vitamin C tidak hanya

dapat mengurangi *browning* tetapi juga mampu meningkatkan regenerasi dari akar. Perendaman eksplan (tulang daun/midrib) karet klon PB 330 dalam 100 mg.L^{-1} vitamin C selama 30 menit dapat menghambat *browning* hingga 30% pada kultur induksi kalus (Admojo & Indriarto, 2016:33).

Jenis arang aktif yang umum digunakan dalam kultur jaringan yaitu arang aktif pro-analis. Arang aktif pro-analis tersebut sulit diperoleh dan memiliki harga yang relatif mahal sehingga diperlukan bahan alternatif yang lebih terjangkau dan mudah ditemukan di pasaran. Berdasarkan hal tersebut, maka penelitian ini dilakukan untuk mendapatkan metode yang tepat untuk peningkatan pembentukan kalus *R. retusa* melalui perendaman eksplan dalam vitamin C dan penambahan arang aktif dalam medium kultur *in vitro*.

METODE PENELITIAN

Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen menggunakan pola faktorial. Perlakuan dalam penelitian ini adalah perendaman eksplan dalam vitamin C dan penambahan arang aktif. Perlakuan penelitian yang dilakukan adalah sebagai berikut:

Table 1. Variasi Perlakuan Vitamin C dan Arang Aktif

Arang Aktif \ Vitamin C	- (AA)	+ Pro-analis (AA-PA)	+ Komersial (AA-K)
Tanpa (C0)	C0 -AA	C0 +(AA-PA)	C0 +(AA-K)
Dengan (C)	C -AA	C +(AA-PA)	C +(AA-K)

Keterangan :

C0 : tanpa perendaman dengan vitamin C

C : dengan perendaman vitamin C

-AA : tanpa penambahan arang aktif

+AA-PA: dengan penambahan arang aktif pro-analis
 +AA-K : dengan penambahan arang aktif komersial

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan November 2017 - April 2018 di Laboratorium Kultur Jaringan Tumbuhan FMIPA UNY.

Bahan dan alat penelitian

Medium dasar kultur *in vitro* yang digunakan adalah NP. Setiap perlakuan diulang sebanyak 4 kali dengan terdiri dari 3 eksplan setiap ulangan.

Prosedur

a. Pembuatan media

Media dasar yang digunakan adalah NP + 150 ml.L⁻¹ air kelapa + 2 mg.L⁻¹ 2,4-D. Variasi perlakuan penambahan arang aktif pada medium kultur *in vitro*, yaitu : 1 g.L⁻¹ arang aktif pro-analis atau komersial. Medium diatur hingga memiliki pH 5,8. Pada medium juga ditambahkan agarose sebanyak 7 g.L⁻¹. Penambahan agarose bertujuan untuk memadatkan medium.

b. Penanaman eksplan

Penanaman dilakukan di dalam kondisi steril *Laminar Air Flow* (LAF). Eksplan daun yang ditanam berasal dari tanaman *Rhynchosytilis retusa* yang telah berumur 18 bulan setelah tanam (mst). Eksplan ditanam ke dalam cawan petri medium yang telah disiapkan. Satu botol perlakuan ditanami masing-masing 3 potong eksplan daun. perlakuan dengan Perendaman eksplan dalam vitamin C, eksplan terlebih dulu direndam dalam 100 ppm vitamin C selama 30 menit sambil digoyang.

Data, Instrumen, dan Teknik Pengumpulan Data

Data yang diperoleh meliputi data tingkat *browning*, persentase eksplan yang membentuk kalus, waktu munculnya kalus, dan ukuran kalus. Data diambil setiap minggu hingga umur eksplan 8 minggu setelah tanam (mst). Data yang diperoleh kemudian dimasukkan kedalam tabel dan dianalisis.

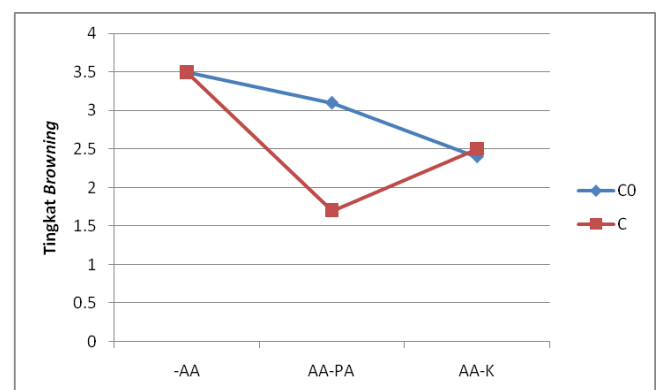
Teknik Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis menggunakan uji *One Way Anova* dengan taraf 5%. Apabila terdapat beda nyata akan dilanjutkan dengan uji DMRT.

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

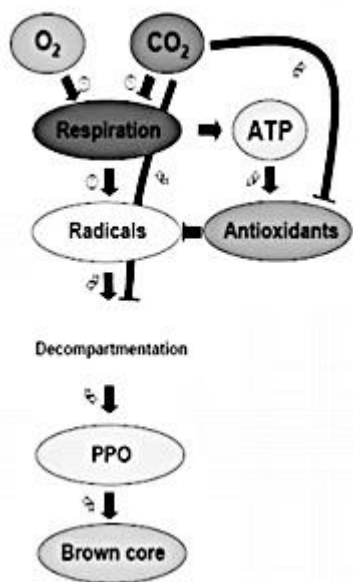
1. Pengaruh Perendaman Vitamin C dan Penambahan Arang Aktif Pada Media Terhadap Tingkat *Browning* Eksplan *R. Retusa*

Seluruh perlakuan menunjukkan peningkatan tingkat *browning* setiap minggunya. Hasil penelitian menunjukkan penambahan arang aktif baik pro-analis maupun komersial dalam medium NP dapat mencegah peningkatan tingkat *browning*. Perlakuan perendaman dengan vitamin C dan penanaman eksplan pada medium yang mengandung AA-PA menghasilkan tingkat *browning* paling rendah.



Gambar 1. Tingkat *browning* eksplan daun *R. retusa* pada umur 8 minggu setelah tanam (mst)

Browning diawali dengan adanya perubahan warna eksplan dari hijau dan kemudian berubah menjadi coklat pada daerah pelukaan. Eksplan yang berwarna kecoklatan menandakan bahwa sel-selnya telah mengalami kematian (Sitinjak *dkk.*, 2015: 35). Ozyigit *et al.* (2008: 1147) menjelaskan bahwa eksplan yang terpotong menyebabkan kandungan sitoplasma dan vakuola tercampur dan keluar sehingga senyawa fenol dapat teroksidasi oleh udara. Proses tersebut terjadi secara enzimatik antara enzim polyfenoloksidase (PPO) dan peroksidase (POD) dengan polifenol yang membentuk quinon yang kemudian terpolimerisasi menghasilkan warna coklat (Gambar 2).



Gambar 2. Mekanisme pencegahan *browning* oleh senyawa antioksidan (Veltman *et al.*, 2003; Lestari, 2016: 31).

Reaksi pencoklatan akan terjadi manakala substrat dan enzim bercampur dan melibatkan oksigen dalam reaksinya (Wardhani *dkk.*, 2016: 141). Hasil ini sesuai dengan penelitian North (2012: 642) bahwa arang aktif mampu

mengurangi fenol yang dikeluarkan oleh eksplan. Arang aktif akan menyerap senyawa yang dikeluarkan oleh eksplan akibat perlukaan (eksudat) yang bersifat toksik. Vitamin C berperan dalam menangkap oksigen bebas sehingga mampu mencegah dekompartemenisasi (pecahnya vakuola dan plastid dalam sel) yang bisa mengaktifkan enzim PPO (Veltman *et al.*, 2003; Admojo & Indriarto, 2016: 31).

2. Pengaruh Perendaman Eksplan dengan Vitamin C dan Penambahan Arang Aktif Pada Media Terhadap Pembentukan Kalus Pada Eksplan *R. Retusa*

Penanaman eksplan pada media yang mengandung arang aktif mampu membentuk kalus. Perlakuan P5 menghasilkan kalus paling besar dengan 0.293 mm, waktu muncul kalus tercepat dan semua eksplan mampu membentuk kalus.

Hasil analisis DMRT menunjukkan pengaruh Perendaman eksplan dengan vitamin C dan Penambahan arang aktif berbeda nyata terhadap besar kalus. Perlakuan kontrol dan perendaman eksplan dengan vitamin C tanpa media yang mengandung arang aktif tidak mampu membentuk kalus.

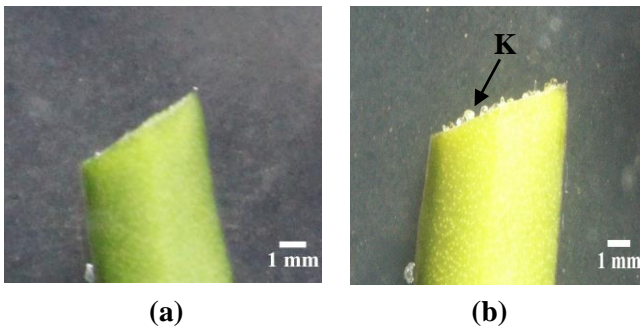
Tabel 2. Ukuran Kalus yang Terbentuk pada Umur 8 mst

Kode Perlakuan	Jumlah eksplan	Persentase eksplan yang membentuk kalus (%)	Waktu muncul kalus (mst)	Rerata panjang kalus (mm)
P1	12	0	-	0.000 a
P2	12	16.67	3	0.040 a
P3	12	83.33	3	0.263 bc
P4	12	0	-	0.000 a
P5	12	100	2	0.298 c

P6	12	58.33	4	0.163 b
----	----	-------	---	---------

Keterangan : Rerata yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan uji DMRT pada taraf 5%.

Kalus hanya terbentuk di daerah pelukaan eksplan pada media yang mengandung arang aktif (Gambar 3). Penambahan AA pada media mengakibatkan warna medium lebih gelap hormon 2,4-D dapat bekerja lebih optimal. Menurut Wattimena (1991: 64), pertumbuhan kalus dapat dihambat dengan adanya cahaya. Intensitas cahaya dapat mendegradasi auksin melalui proses fotooksidasi sehingga struktur kimia auksin akan berubah yang menyebabkan kerja enzim menjadi terhambat.



Gambar 3. Kalus yang terbentuk pada daerah pelukaan eksplan *R. retusa*, (a): umur 0 mst; (b): umur 8 mst. K = kalus.

Pertumbuhan kalus meningkat dengan kombinasi perlakuan perendaman vitamin C dan penambahan arang aktif. Selain sebagai antioksidan dalam mencegah terjadinya *browning*, vitamin C berperan penting dalam metabolisme sel. Terbentuknya kalus menandakan bahwa proses penyerapan unsur hara mampu berjalan dengan baik. Penelitian Setiawan (2003: 28) menunjukkan bahwa penambahan vitamin C mampu meningkatkan pertumbuhan

kalus daun pule pandak (*Rauwolfia serpentine* Benth.), begitu juga menurut Feng-jie *et al.* (2007: 280) yang melaporkan bahwa pra-perlakuan pencelupan eksplan *Platanus occidentalis* L. dalam antioksidan vitamin C 10 g.L^{-1} dapat mengurangi kontaminasi dan pencoklatan secara efektif. Vitamin C mampu mengikat radikal bebas yang dihasilkan ketika eksplan dilukai dan mencegah terjadinya oksidasi, sedangkan arang aktif akan mengadsorpsi senyawa inhibitor yang terdapat di media sehingga mampu menurunkan aktivitas metabolisme senyawa toksik dan mencegah akumulasi eksudat (Safwat *et al.*, 2015: 52).

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat diambil kesimpulan bahwa :

1. Perendaman eksplan dengan vitamin C yang diikuti dengan penanaman eksplan pada medium yang mengandung arang aktif terbukti mampu menghambat *browning*
2. Arang aktif pro-analis mampu meningkatkan pembentukan kalus lebih tinggi dibanding arang aktif komersial pada eksplan daun *R. retusa*

Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk meningkatkan pembentukan kalus Melalui penentuan waktu perendaman dan konsentrasi vitamin C yang optimum
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk meningkatkan ukuran kalus dan kandungan senyawa metabolit sekunder yang berpotensi

sebagai obat Melalui penentuan jenis dan konsentrasi hormon

3. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk menginduksi pembentukan embrio somatik dan meningkatkan daya regenerasi embrio untuk memperbanyak tanaman

DAFTAR PUSTAKA

- Admojo, L. & Indriarto, A. 2016. Pencegahan *browning* fase inisiasi kalus pada kultur midrib daun klon karet (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) PB 330. *Jurnal Penelitian Karet* 34(1): 25-34.
- Arjinal, Yuharmen, & Teruna, H.Y. 2016. Isolasi dan uji aktivitas antibakteri dari tumbuhan *Spathoglattis aurea* Lindl. *Jurnal FMIPA Unri* 1-7.
- Daisy P., Hendaryono, S., & Wijaya, A. 1994. *Teknik Kultur Jaringan*. Yogyakarta: Kanisius.
- Feng-jie, T., Zhi-yi, Z., Jun, Z., Na, Y., & Dong-mei, W. 2007. Contamination and browning in tissue culture of *Platanus occidentalis* L. *Forestry Studies in China*, 9(4): 279-282.
- George, E.F & P.D Sherrington. 1984. *Plant propagation by tissue culture*. Exegetics Limited, Basingstokes: viii + 709 hlm.
- Hutami, S. 2008. Masalah pencoklatan pada kultur jaringan. *Jurnal AgroBiogen* 4(2): 83-88.
- Irawati. 2002. Konservasi anggrek spesies di Indonesia. *Prosiding Seminar Angger Indonesia*, Yogyakarta, 20 Oktober 2002.
- Ko, W.H., Su, C.C., Chen, C.L., & Chao, C.P. 2009. Control of lethal browning of tissue culture plantlets of cavendish Banan cv. Formosana with ascorbic acid. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 93: 137-141.
- Lestari, E.G. 2011. Peranan zat pengatur tumbuh dalam memperbanyak tanaman melalui kultur jaringan. *Jurnal AgroBiogen* 7(1): 63-68.
- North, J.J., Ndakidemi, P.A., & Laubscher, C.P. 2012. Effect of Antioxidants, plant growth regulators and wounding on phenolic compound excretion during micropropagation of *Strelitzia reginae*. *International Journal of the Physical Sciences* 7(4): 638-646.
- Ozyigit, I. I., Kahraman M. V & O. Ercan. 2007. Relation between explant age, total phenols and regeneration response of tissue cultured cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *African Journal Biotechnology* 6(1): 3-8.
- Purnamaningsih, R. 2002. Regenerasi tanaman melalui embriogenesis somatik dan beberapa gen yang mengendalikannya. *Buletin Agrobio* 5(2): 51-58.
- Safwat, G., Abdul-Rahman, F., & Sharbasy, S. El. 2015. The effect of some antioxidants on blackening and growth of in vitro of banana (*Musa* spp.cv Grand Naine). *J. Genet. Cytol* 44: 47-59.
- Setiawan, Mahmud. 2003. Pengaruh penambahan asam askorbat terhadap pencoklatan dan pertumbuhan kals daun pule pandak (*Rauwolfia serpentine Benth*) yang dikulturkan secara *in vitro*. *Undergraduated thesis*, Fmipa Undip.
- Sitinjak, M. A., Isda, M. N., & Fatonah, S. 2015. Induksi kalus dari eksplan daun *in vitro* dengan perlakuan 2.4-D dan kinetin. *Al-Kauniyah Jurnal Biologi*, 8(1): 32-39.
- Thomas, T.D. 2008. The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnoloty Advances* 26: 618-631.
- Veltman, R.H., Lenthéric, J., Van der Plas, L.H.W & Peppelenbos, H.W. 2003. Inter al browning in pear fruit (*Pyrus communis* L., cv Conference) may be a result of limited availability of energy and antioxidants. *Postharverst Boil. Technol.* 28: 295-302.

- Wardhani, D. H., Yuliana, A. E., & Dewi, A. S. 2016. Natrium metabisulfit sebagai anti-*browning agent* pada pencoklatan enzimatik rebung ori (*Bambusa arundinacea*). *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan* 5(4): 140-145.
- Wattimena, G. A. 1991. *Zat Pengatur Tumbuh Tanaman*. Bogor: PAU.
- Widiastoety, D & B. Marwoto. 2004. Pengaruh berbagai sumber arang dalam media kultur *in vitro* terhadap pertumbuhan planlet *Oncidium*. *J. Hort* 14(1): 1-5.
- Wulandari, A. S. 2014. Pengaruh bahan sterilan terhadap keberhasilan inisiasi eksplan paulownia (*Paulowina elongate* SY Hu) Secara *In vitro*. *Jurnal Silvikultur Tropika* 5(1): 1-6.