

# **PENGARUH HORMON PERTUMBUHAN (2,4D dan KINETIN) DALAM MEDIA MURASHIGE-SKOOG SERTA PENAMBAHAN PVP TERHADAP PERTUMBUHAN KALUS TANAMAN *Mentha arvensis L.***

**Rahma Aliya<sup>1</sup>**

**Abstract :** *Mentha arvensis L.* is a kind of medical plant that produce peppermint oil and the mentol which has many benefits as an antispasmodic, antiseptic, analgetic, etc. The need for peppermint oil and mentol increase every year. The peppermint oil and mentol can be produced by the tissue culture method.

The research has purpose to understand of effect from the growth hormone (2,4D and kinetin) in Murashige-Skoog media and also increase PVP to growth callus *Mentha arvensis L.*

The research has done in several steps: made the Murashige-Skoog media with various growth hormones. Media A (2,4 D 1ppm + Kinetin 0,1ppm), Media B (2,4D 1ppm + Kinetin 1ppm), Media C (2,4D 2,5ppm + Kinetin 0,1ppm), Media D (2,5ppm + Kinetin 1ppm). Besides that this research also to do PVP oriented as sequestering agent. PVP oriented is 1%; 1,2%; 1,5%; 2%.

The explant used is the leaf. The first step in this research is prasterilization using the 'owing water for 1 hour and then followed by sterilization by using sunclin. The time sterilization oriented by using sunclin is 5 minutes, 10 minutes, 13 minutes, 15 minutes. The result showed that the fastest of the *Mentha arvensis L.* callus growth in Murashige-Skoog media in media A (2,4D 1ppm + Kinetin 0,1ppm) by using PVP 1,5% and also the explant time sterilization is 13 minutes.

**Key words :** *Mentha arvensis L.*, media, callus

## **PENDAHULUAN**

Selama sepuluh tahun terakhir ini obat dan obat-obatan yang berasal dari tumbuhan mendapat perhatian yang semakin meningkat. Hal ini disebabkan adanya kemauan politik pemerintah melalui kebijakan departemen kesehatan dalam usaha yang mendukung perkembangan obat dan obat tradisional di Indonesia. Selain itu juga makin meningkatnya jumlah industri obat tradisional setiap tahunnya (Hargono dan Suporaharjo, 1994).

Industri obat tradisional umumnya masih mengandalkan alam untuk

menyediakannya. Pola pemungutan seara liar dengan semata-mata mengandalkan produksi atau kemampuan reproduksi alami masih sangat tinggi tanpa adanya upaya budidaya yang dilakukan secara teratur. Jika pemungutan secara liar ini terus berlangsung, dalam waktu singkat akan mengancam kelestarian persediaan (Hargono dan Suporaharjo, 1994).

Dengan demikian pembudidayaan tanaman obat serta upaya pelestariannya merupakan salah satu alternatif yang harus segera dilakukan untuk menjamin kontinuitas bahan baku obat.

Pembudidayaan tanaman dapat dilakukan dengan teknik Kultur Jaringan

Tanaman (KJT). Teknik Kultur Jaringan Tanaman merupakan cara yang sangat sederhana yaitu suatu sel atau irisan jaringan tanaman yang disebut eksplan secara aseptik diletakkan dan dipelihara dalam media padat atau cair yang cocok dan dalam keadaan steril. Dengan cara demikian sebagian sel pada permukaan irisan tersebut akan mengalami proliferasi dan menjadi kalus (Hendaryono dan Wijayani, 1994).

Kalus merupakan suatu amorf yang terdiri dari sel-sel parenkim yang muncul dari sel-sel jaringan induk yang memperbanyak diri. Kalus dapat terbentuk dari bagian tumbuhan yang dilukai atau diserang bakteri. Sifat yang terpenting dari kalus adalah bahwa bagian abnormalnya merupakan potensi untuk membentuk akar, tunas, embrio yang dapat tumbuh menjadi tanaman bibit (Dodds dan Robert, 1982).

Media yang digunakan dalam penelitian ini adalah Murashige-Skoog (MS). Media tersebut mengandung senyawa anorganik, sumber kation, unsur mio-inositol, vitamin dan zat pengatur tumbuh. Media kultur jaringan sangat dipengaruhi oleh pH. Hal ini berkaitan dengan ketersediaan larutan ion mineral dan memacu pertumbuhan eksplan. pH media kultur jaringan relatif sempit dengan titik optimal pH 5,0 – 6,0.

Pada penelitian kali ini zat pengatur tumbuh yang digunakan adalah dari golongan auksin yaitu 2,4 Diklorofenoksiasetat (2,4D), dan dari golongan sitokinin yaitu kinetin. Auksin berfungsi untuk merangsang sel apikal batang dan koleoptil, menaikkan tekanan osmotik, meningkatkan sintesis protein, dll (Hendaryono dan Wijayani, 1994).

*Mentha* spp. Termasuk dalam familia labiatae dan termasuk penghasil minyak permen dan mentol yang banyak digunakan dalam industri farmasi. Misalnya sebagai bahan antiseptik, antipasmodik, analgetik, dan stimulant

(Sulfani dan hobir, 1994). Kandungan utama dalam *Mentha arvensis L.* adalah saponin, flavonoid dan polifenol disamping minyak atsiri (Syamsuhidayat dan Hutapea, 1991).

Bagian tanaman (eksplan) yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun. Eksplan harus bebas dari kontaminan mikroorganisme seperti bakteri dan jamur. Oleh karena itu pengerjaan kultur jaringan tanaman diperlukan kondisi yang aseptik.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penambahan zat pengatur tumbuh (2,4D + kinetin) ke dalam media Murashige-Skoog yang paling cepat merangsang kalus. Selain itu juga penambahan PVP sebagai zat yang dapat menghambat keluarnya polifenol dari eksplan (daun) yang dapat mengakibatkan kalus menjadi coklat. Lamanya waktu yang diperlukan untuk sterilisasi juga menjadi perhatian dalam penelitian ini.

Sejauh peneliti ketahui belum pernah ada penelitian mengenai perbandingan hormon pertumbuhan (2,4D + kinetin) dan penambahan PVP terhadap pertumbuhan kalus tanaman *Mentha arvensis L.* Dari latar belakang tersebut di atas dapat dirumuskan permasalahan sebagai berikut : Berapakah perbandingan hormon pertumbuhan (2,4D + kinetin) yang dapat merangsang dengan cepat pertumbuhan kalus tanaman *Mentha arvensis L.*, berapakah kadar PVP yang harus ditambahkan ke dalam media Murashige-Skoog yang dapat menghambat pengeluaran fenol dari kalus tanaman *Mentha arvensis L.* berapakah waktu yang diperlukan untuk sterilisasi eksplan dengan menggunakan sunclin®.

Penelitian ini penting dilakukan karena untuk menghindari terjadinya kepunahan tanaman *Mentha arvensis L.* Semakin banyak industri obat yang menggunakan minyak permen dan mentol sebagai zat aktif dalam obatnya.

## METODE PENELITIAN

### Bahan dan Cara Kerja

#### A. Bahan dan Alat

##### 1. Bahan penelitian

*Mentha arvensis L.* (rumah kaca bagian Biologi Farmasi Fakultas Farmasi UGM). Agar bacteriological (agar no.1), oxoid. Garam organik / makronutrien (ammonium nitrat, kalium dihidrogen fosfat, kalium nitrat, kalsium klorida, magnesium sulfat heptahidrat. Garam anorganik / mikronutrien (asam borat, kaliumiodida, kobalt (II) klorida, natrium molibdat, seng sulfat heptahidrat, tembaga (II) sulfat pentahidrat. Sumber besi (besi (II) sulfat heptahidrat, natrium etilendiamin). Vitamin dan zat tambahan lain (asam nikotinat, Glisn, piridoksin hidroklorida, tiamin hidroklorida, mio-inositol). Sumber karbon (sukrosa). Zat pengatur tumbuh (2,4Diklorofenoksi asetat, kinetin). Desinfektan (natrium hipoklorit / sunclin<sup>®</sup>, etanol teknik 70%).

##### 2. Alat penelitian

*Laminar Air Flow cabinet* (Pharmeq laboratories). Otoklaf (sakura, Jepang). Alat-alat gelas. Timbangan listrik (Libror, Shimadzu, Jepang). Pinset, skapel dan tangkainya. Almari pendingin. Pengaduk magnetik. Lampu spiritus. Kertas pH / pH meter.

#### B. Cara kerja

##### 1. Sterilisasi alat

Alat yang digunakan dalam kultur (pinset, gagang skapel, dan cawan petri) dibungkus dengan kertas koran, Erlenmeyer yang telah berisi akuadest dan erlenmeyer kosong ditutup dengan aluminium foil. Alat tersebut kemudian disterilkan dengan otoklaf pada suhu 121 °C selama 20 menit.

##### 2. Sterilisasi ruangan

*Laminar Air Flow (LAF) cabinet* dibersihkan lalu disemprot dengan alcohol 70%. Kemudian alat-alat gelas, pinset, gagang skapel, pisau, lampu spiritus, botol berisi alcohol 70% (tempat pinset dan skapel) serta media dimasukkan ke dalam *Laminar Air Flow cabinet*. Lampu UV dalam *Laminar Air Flow cabinet* dinyalakan

##### 3. Pembuatan media Murashige-Skoog padat dan sterilisasi media

Bahan-bahan yang digunakan dalam pembuatan media disiapkan. Sukrosa, mio-inositol, agar, ditimbang. Larutan mikronutrien, larutan makronutrien, larutan besi, larutan vitamin serta larutan 2,4D dan kinetin dicampur kedalam gelas piala, kemudian sukrosa dan mio-inositol dimasukkan kedalam campuran tersebut dan ditambah sedikit air suling lalu diaduk sampai larut. Kemudian ditambahkan air suling 4/5-nya. pH larutan diukur dengan menggunakan kertas pH dan dibuat pH larutan 5,8-5,9. Bila terlalu asam maka dapat ditambah KOH 3% *b/v* dan bila terlalu basa maka dapat ditambah HCl 1% *b/v*. Setelah itu air suling ditambahkan sampai volume yang ditentukan. Lalu tambahkan agar dan setelah itu dipanaskan dan diaduk dengan menggunakan *stirer* (pengaduk magnetik) sampai larutan jernih dan mendidih.

Kemudian larutan dituang kedalam botol-botol kecil dengan volume yang sama. Lalu botol tersebut ditutup dengan kertas aluminium foil dan disterilkan dengan otoklaf dengan suhu 121 °C selama 20 menit. Dilakukan orientasi terhadap konsentrasi zat pengatur tumbuh yang digunakan.

Tabel I.  
Orientasi Konsentrasi zat pengatur tumbuh yang digunakan

Macam Media	2,4 D (ppm)	Kinetin (ppm)
A	1	0,1
B	1	1
C	2,5	0,1
D	2,5	1

#### 4. Penyedia eksplan

Tanaman yang digunakan sebagai sumber eksplan adalah daun yang masih sangat muda yang telah berkembang dengan baik dan sehat.

#### 5. Sterelisasi eksplan

Eksplan terlebih dahulu dicuci dengan air mengalir kemudian didiamkan di air mengalir selama 1 jam.

Eksplan disterilkan dengan 15 ml sunclin<sup>®</sup> dalam 100ml akuadest steril dan ditambah 3 tetes tween 80. Dilakukan orientasi terhadap waktu sterilisasi. Setelah itu sterilan dituang dalam erlenmeyer kosong dan dilakukan pencucian dengan akuadest steril sebanyak 3 kali

Tabel II  
Orientasi waktu sterilisasi eksplan dengan 15 ml sunclin<sup>®</sup>

Penanaman (botol)	Waktu sterilisasi (menit)
10	5
10	10
10	13
10	15

#### 6. Penamaan eksplan

Eksplan yang telah disterilkan diambil dengan pinset steril, diletakkan dalam piring petri yang berisi kertas saring kemudian dipotong-potong. Pemotongan diusahakan sekecil mungkin dengan ukuran  $\pm 1\text{cm} \times 1\text{cm}$ . eksplan kemudian dilukai atau digores tetapi tidak sampai putus dengan menggunakan skalpel. Eksplan selanjutnya dimasukkan dalam media dengan sedikit penekanan supaya bersinggungan dengan permukaan media. Botol yang berisi eksplan tersebut selanjutnya diinkubasi dalam ruang kultur pada suhu 22-28°C, disinari dengan lampu TL Day Light 40 watt dengan pencahayaan selama 16 jam terang 8 jam gelap sampai bentuk kalus.

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Peralatan yang digunakan pada kultur jaringan tanaman perlu disterilkan untuk

mematikan mikroorganisme yang ada. Ruang kerja untuk pengerjaan steril menggunakan *Laminar Air Flow* (LAF) sebab LAF dapat membuat udara yang melintasi kawasan kerja menjadi steril karena ditiupkan secara kontinyu melewati tempat kerja tersebut. Sebelumnya udara tersebut telah disaring melalui prefilter dan ultrafilter sehingga bebas dari debu dan spora.

Media Murashige-Skoog merupakan media yang paling banyak digunakan dalam kultur jaringan tanaman. Keistimewaan media ini adalah mempunyai kandungan nitrat, kalium dan ammonium yang tinggi. Keberhasilan dalam penumbuhan kalus juga dipengaruhi oleh perbandingan zat pengatur tumbuh yang sesuai sebab dalam tanaman zat pengatur tumbuh dapat mendukung, menghambat dan dapat merubah proses fisiologi tumbuhan. Pada

penelitian ini digunakan zat pengatur tumbuh dari golongan auksin yaitu 2,4 D dan dari golongan sitokinin yaitu kinetin.

Dari hasil orientasi diperoleh data bahwa media yang cocok yaitu media A dengan zat pengatur tumbuh 2,4 D 1ppm dan kinetin 0,1 ppm. Media A mampu menghasilkan waktu inisiasi kalus tercepat. Hal ini disebabkan karena 2, D

dapat menyebabkan terjadinya pertumbuhan akar dan pertumbuhan kalus. Sedangkan kinetin dapat merangsang pembelahan sel dalam jaringan. Jika kadar 2,4D lebih tinggi daripada kinetin maka dapat menyebabkan pertumbuhan kalus (Wetherell, 1982). Sehingga selanjutnya hanya digunakan media A untuk menumbuhkan kalus *Mentha arvensis* L.

Tabel III  
Orientasi waktu inisiasi kalus (hari) dalam berbagai media Murashige-Skoog

No.	Media A	Media B	Media C	Media D
1	3	5	5	6
2	3	5	5	5
3	3	4	4	5
4	2	4	5	8
5	4	4	6	8
6	3	5	9	7
7	2	5	7	7
8	3	7	7	8
9	2	6	9	6
10	3	6	7	6
Mean	2,8	5,1	6,4	6,6

Pada saat pembuatan media perlu diperhatikan besarnya pH sebab menentukan kelarutan, ketersediaan ion-ion, mineral dan juga sifat gel. Jarak efektif pH media sekitar 5,7-5,8 (George dan Sherington, 1984).

Pada saat penelitian ditambahkan PVP (Polivinilpirolidon) sebagai *sequestering agent*. Hal ini dilakukan untuk mencegah terjadinya pencoklatan

pada kalus. Polifenol yang terdapat dalam kalus *Mentha arvensis* L. bersifat toksik bagi tanaman itu sendiri sehingga kalus akan mengalami pencoklatan dan bila dibiarkan kalus akan mati. Dengan penambahan PVP maka dapat menghambat keluarnya polifenol sehingga kalus tidak akan berwarna coklat. Hasil orientasi penambahan PVP dalam Murashige-Skoog tampak pada tabel IV.

Tabel IV  
Hasil orientasi penambahan PVP dalam media Murashige-Skoog (media A)

No. Botol	Kadar PVP			
	1%	1,2%	1,5%	2%
1.	Coklat	Coklat	-	-
2.	-	Coklat	Coklat	-
3.	Coklat	-	-	Coklat
4.	Coklat	-	-	-
5.	Coklat	Coklat	-	-

Dari data diatas tampak bahwa kadar PVP yang dapat menghambat terjadinya gram PVP dalam 100ml media. Untuk selanjutnya kedalam media ditambahkan PVP 1,5%.

Untuk membuat media padat dapat ditambahkan agar. Penambahan agar harus tepat sebab jika konsentrasi agar terlalu rendah maka media akan lembek dan eksplan yang ditanam akan mudah tenggelam. Jika konsentrasi agar terlalu tinggi maka media akan menjadi keras sehingga nutrient dalam media tidak dapat terserap oleh eksplan.

Kondisi aseptik sangat diperlukan dalam kultur jaringan tanaman. Untuk menjaga kondisi aseptik maka media dan alat-alat kultur harus disterilkan. Sterilisasi media dengan menggunakan otoklaf bertekanan 1,5 atm dengan suhu 121°C selama 20 menit.

Eksplan yang digunakan adalah daun yang cukup muda. Jika daun terlalu muda maka pada saat sterilisasi dengan zat kimia akan mudah rusak tetapi jika daun terlalu tua maka kalus akan cepat berwarna coklat karena kandungan polifenol yang merupakan zat toksik sudah menumpuk sehingga dapat menghambat pertumbuhan kalus.

Sebelum eksplan ditanam perlu dilakukan pencucian dengan air selama 1 jam sambil digosok bagian permukaannya. Selanjutnya dilakukan sterilisasi dengan zat kimia (sunclin®). 15ml sunclin® dalam 100ml aquadest ditambah 3 tetes tween 80. Penggunaan tween 80 dimaksudkan sebagai wetting agent sehingga sterilan dapat menembus jaringan daun. Waktu sterilisasi yang digunakan untuk setiap tanaman berbeda-beda sehingga perlu dilakukan orientasi.

Tabel V.  
Hasil orientasi waktu sterilisasi dengan sunclin®

Penanaman (botol)	Waktu Sterilisasi (menit)	Kalus yang tumbuh (botol)	Keberhasilan (%)
10	5	0	0
10	10	3	30
10	13	6	60
10	15	4	40

Sterilisasi dengan 15ml sunclin® dalam 100ml aquadest dengan waktu sterilisasi kalung paling banyak. Jika menggunakan waktu sterilisasi 10 menit atau kurang, jamur dan mikroorganisme masih dapat hidup tetapi jika menggunakan waktu sterilisasi 15 menit eksplan akan berwarna coklat. Hal ini disebabkan karena eksplan terlalu lama terendam dalam sunclin®. Kandungan utama sunclin® adalah natrium hipoklorit yang bersifat merusak jaringan eksplan

akibatnya jaringan akan mati dan berubah menjadi coklat.

Ukuran eksplan yang akan ditanam harus sesuai artinya eksplan tidak terlalu kecil dan juga tidak terlalu besar sebab jika terlalu kecil maka jaringan meristem yang ada hanya sedikit sehingga kalus yang dihasilkan akan sedikit. Tetapi jika terlalu besar maka akan mudah terjadi kontaminasi dan kadang respon yang dihasilkan akan lambat. Eksplan yang telah dipotong-potong ditanam dalam media dengan sedikit penekanan.

Tujuannya supaya nutrisi dalam media dapat terserap dengan sempurna. Tetapi diusahakan jangan sampai menyulitkan pengambilan kalus pada saat melakukan subkultur.

Waktu inisiasi pembentukan kalus adalah waktu yang dibutuhkan eksplan untuk mengawali pembentukan kalus, yang ditandai dengan adanya benjolan berwarna putih pada sisi daun.

Pengamatan dilakukan pada media A sebanyak 40 botol. Dimulai pada saat penanaman sampai munculnya benjolan putih. Hasil pengamatan dicantumkan dalam tabel VI.

Dari tabel tampak bahwa waktu inisiasi kalus rata-rata  $5,2 \pm 0,9$  atau sekitar 4-6 hari.

Tabel VI.  
Waktu inisiasi kalus dalam Hari

No. Botol	Hari ke-
1.	5
2.	5
3.	5
4.	5
5.	5
6.	-
7.	4
8.	5
9.	5
10.	4
11.	6
12.	6
13.	6
14.	4
15.	4
16.	6
17.	-
18.	4
19.	4
20.	4

No. Botol	Hari ke-
21.	4
22.	4
23.	4
24.	4
25.	6
26.	6
27.	-
28.	6
29.	7
30.	4
31.	6
32.	6
33.	6
34.	6
35.	6
36.	6
37.	6
38.	6
39.	6
40.	6

## KESIMPULAN DAN SARAN

### Kesimpulan

Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa kalus tanaman *Mentha arvensis L.* dapat tumbuh baik pada media Murashige-Skoog dengan penambahan zat pengatur tumbuh 2,4D 1ppm dan kinetin 0,1ppm.

Polifenol yang terdapat dalam kalus *Mentha arvensis L.* dapat dihambat

pengeluarannya dengan PVP 1,5% sehingga kalus yang terbentuk tidak berwarna coklat.

Eksplan yang digunakan adalah daun yang cukup muda.

Tehnik kultur jaringan tanaman sangat memerlukan kondisi yang aseptik sehingga sebelum digunakan alat, media maupun eksplan harus disterilkan terlebih dahulu. Hasil penelitian menunjukkan

bahwa waktu yang efektif untuk sterilisasi eksplan daun dari tanaman *Mentha arvensis L.* adalah 13 menit dengan menggunakan 15ml sunclin dalam 100ml air.

### **Saran**

Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mengetahui pengaruh media MS terhadap pertumbuhan kalus tanaman *Mentha arvensis L.* secara optimal.

### **DAFTAR PUSTAKA**

- Delany F., 1998, *Profil Pertumbuhan Kalus Ocimum basilicum L. forma violaceum dalam media Murashige-Skoog*, Skripsi, Fakultas Farmasi, UGM, Yogyakarta.
- Dodds, J.H., Roberts, L.W., 1982, *Plant tissue Culture*, Cambridge University Press, USA, 10-49
- George, E.R., Sherrington, L.R., 1984, *Plant Propagation by Tissue Culture*, Exegetic Press Inc, Orlando San Diego, 45050, 199-201, 284-330.
- Hargono D., Suporaharjo, 1994, *Industri Obat Tradisional di Indonesia, Pelestarian Pemanfaatan keanekaragaman Tanaman Obat Hutan Tropika Indonesia*, editor Ervizal A.M., Zuhud, dan Haryanto, Bogor, 51-63.
- Hendaryono D.P.S., Wijayani, A, 1994, *Teknik Kultur jaringan, edisi II*, Kanisius, Yogyakarta, 17-20, 90-94.
- Sulfianihidayat, S.S., Hutapea, J.R., 1991, *Inventaris Tanaman Obat Indonesia*, Jilid I, depart. Kesehatan RI, Jakarta, 220.