

OPTIMASI MEDIA PENUMBUH KALUS SEBAGAI LANGKAH AWAL UPAYA BUDIDAYA *IN-VITRO* TANAMAN *Vitex Trifolia* L

OPTIMIZATION OF CALLUS GROWTH MEDIUM OF *Vitex Trifolia* IN *IN-VITRO* CULTURE

Andayana Puspitasari, CJ. Soegihardjo

Bagian Biologi Farmasi Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian upaya budidaya in-vitro tanaman *Vitex trifolia*, L, menggunakan kalus dengan optimasi media penumbuhnya. Dewasa ini upaya pencarian obat baru dari tanaman semakin gencar dilakukan. Tanaman *Vitex trifolia* atau Legundi telah digunakan sejak zaman dahulu untuk mengobati bengkak dan karminativa dan menurut hasil penelitian terdahulu menunjukkan bahwa kandungan senyawa *Vitexicarpin* dan viteosin-A pada tanaman legundi dapat digunakan sebagai trakheospasmolitik. Mengingat kegunaan tanaman ini, maka perlu dilakukan penelitian mengenai budidaya secara in-vitro dengan menggunakan teknik kultur jaringan tanaman (KJT).

Penelitian ini bertujuan untuk mencari cara sterilisasi yang sesuai dan mengukur bentuk pertumbuhan kalus dari eksplan daun yang ditanam pada media Murashige-Skoog (MS) padat dengan berbagai kombinasi zat pengatur tumbuh (zpt) 2,4 *Dichlorophenoxy acetic acid* (2,4 D) dan kinetin, kemudian membandingkan kandungan kimia kalus dengan tanaman asal.

Eksplan yang berupa daun tanaman *Vitex trifolia* dikumpulkan dari kebun bagian Biologi Farmasi Fakultas Farmasi UGM dicuci dibawah air mengalir selama 10 menit, kemudian disterilkan dengan merendang dalam campuran sublimat dan bahan pembasah tween 80. Secara aseptis dalam *Laminar Air Flow* (LAF) eksplan ditanam pada media MS padat telah dicampur dengan berbagai kombinasi zpt 2,4 D dan kinetin, kemudian diinkubasi selama waktu tertentu dengan suhu $25 \pm 3^{\circ}$ C dengan penerangan cahaya lampu TL 40 watt 16 jam perhari. Setelah 25-30 hari kalus yang terbentuk disubkultur, 14-16 hari kemudian kalus dipanen dan dikeringkan. Hasil kalus kering dan serbuk daun *Vitex trifolia* dimaserasi dengan kloroform-metanol (1:1). Maserat yang dipekatkan ditotolkan pada lempeng silika gel GF 254 dengan fase gerak Kloroform-Etil asetat (1 0: 1).

Metode sterilisasi yang sesuai untuk menumbuhkan kalus dari eksplan daun *Vitex trifolia* adalah campuran sublimat 0,05 % dan tween 80 dua tetes per 100 ml air, untuk merendam selama 10 menit. Kombinasi zat pengatur tumbuh yang paling sesuai adalah media MS padat dengan 2,4 D 1mg/L + kinetin 1 mg/L. Hasil kromatogram menunjukkan bahwa kombinasi zpt tidak mempengaruhi profil KLT, dan kromatogram metabolit sekunder yang terkandung pada tanaman asal maupun pada kalus tidak berbeda nyata..

Kata kunci : budidaya in-vitro, *Vitex trifolia*

ABSTRACT

A research has been done to optimize of callus growth medium of *Vitex trifolia* plants in in -vitro culture. These recent years, people start searching new drugs from plants. *Vitex trifolia* or Legundi has been used to cure swell and as a carminative. The last research reported that this plant contains viteosin-a and vitexicarpin which can used as tracheo-spasmolytic.

The aimed of this research was to find the sterilization method and to measure the callus growth from leaf explant planted in Murashige-Skoog (MS) solid medium in many combinations of 2,4 *Dichlorophenoxy acetic acid* (2,4D) and kinetin, afterwards the compounds content in callus and in original plant was compared.

The leaf of *Vitex trifolia* which had been collected from Pharmaceutical Biology department, faculty of Pharmacy garden was washed in water stream and sterilized by developing into solution of

mercury chloride and with tween 80.(as the wetting agent). Using Laminar air flow the explant was planted aseptically in MS solid medium. Culture vessels were placed in a cabinet at $25 \pm 3^\circ \text{C}$, and radiated 16-hour daily using TL lamp (40 watts). After 25-30 days, the callus were subcultured, then after 14-16 days the subculture callus were collected and dried at $50-80^\circ\text{C}$. The dried callus and dry powdered leaf of *Vitex trifolia*, were macerated with chloroform-methanol (1: 1), then the concentrated extractan was applied on a silica gel GF 254 plate and eluated with chloroform-etil acetate (10: 1).

The optimal of sterization method was developing explants in solution of 0,05 % mercury chloride and two drops of tween 80 per 100 ml mixture, for 10 minutes. The optimal combination of 2,4D and kinetin for growing callus in growth MS solid medium was 1 mg/L: 1 mg/L. The Chromatograms show that the chemical constituents in callus are not influenced by variation of growth fertilizer agent in medium plant and the chromatogram of secunder metabolites fund in original plant as well as in callus had no significantly different.

Key words: in-vitro culture, *Vitex trifolia*

PENDAHULUAN

Setiap tahun ditemukan hampir 1500 macam senyawa baru yang berasal dari tanaman, 20 % diantaranya mempunyai aktivitas biologi tertentu. Kebanyakan produk asal tanaman tadi dalam skala komersial diperoleh dengan cara isolasi. Hal ini menimbulkan masalah yang cukup serius, karena meningkatnya kebutuhan akan obat, mengakibatkan meningkatnya permintaan akan bahan tanaman penghasilnya (Indrayanto, 1988). Bila tidak diimbangi dengan upaya pembudidayaan, akan terjadi pelangkaan jenis tumbuhan obat tertentu.

Tanaman Legundi (*Vitex trifolia*. L) merupakan tanaman perdu atau pohon kecil, daunnya yang berbau aromatis telah digunakan sejak dulu untuk obat penurun panas dan karminativa (Heyne, 1987), selain itu dari penelitian yang dilakukan oleh Gemini Alam dkk (1999) terbukti bahwa *Vitex trifolia* mengandung senyawa *Vitexicarpin* dan viteosin-A yang mempunyai khasiat trakheo-spasmolitik. Mengingat kegunaan tanaman *Vitex trifolia* yang cukup besar ini maka perlu dilakukan usaha-usaha untuk mencegah kelangkaan populasinya.

Budidaya in-vitro dengan menggunakan teknik kultur jaringan (KJT) merupakan salah satu jalan untuk mengatasi masalah tersebut, karena dengan teknik KJT ini dapat dihasilkan tanaman yang steril dan tahan terhadap penyakit sehingga sangat baik digunakan sebagai bahan baku simplisia juga dengan rekayasa tertentu dapat dihasilkan kadar senyawa berkhasiat yang lebih tinggi dari tanaman asal.

Adapun tujuan penelitian ini adalah mencari kondisi yang sesuai untuk menumbuhkan kalus dari daun *Vitex trifolia* yang meliputi : pemilihan cara sterilisasi yang sesuai, mengukur bentuk pertumbuhan kalus yang ditanam pada media MS padat dan membandingkan kandungan kimia kalus dengan tanaman asal menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT).

METODOLOGI PENELITIAN

Bahan : Bahan yang diperlukan adalah tanaman *Vitex trifolia* yang diambil di kebun bagian Biologi Farmasi Fak. Farmasi UGM, dan telah diidentifikasi oleh Laboratorium Biologi Farmasi, bahan-bahan untuk membuat media MS, agar E-Merck.

Alat : Alat yang diperlukan antara lain botol kultur, alat-alat gelas, Laminar Air Flow (LAF).

Prosedur pelaksanaan

Dibuat media MS padat yang diberi zat pengatur tumbuh 2,4 Diklorofenoksi asam asetat (2,4 D) dan kinetin pada perbandingan sebagai berikut:

Tabel I. Kombinasi zat penumbuh dalam medium MS

Kode	mg/L 2,4 D	mg/L Kinetin
M1	0,5 mg/L	0,5 mg/L
M2	0,5 mg/L	1 mg/L
M3	1 mg/L	0,5 mg/L
M4	1 mg/L	2 mg/L
M5	2 mg/L	1 mg/L
M6	1 mg/L	1 mg/L

Media selanjutnya dimasukkan kedalam botol kultur dan disterilkan menggunakan otoklaf. Penanaman eksplan diawali dengan pencucian eksplan dibawah air mengalir, kemudian disterilkan dengan merendam dalam sublimat dan bahan pembasah tween 80, selanjutnya ditanam secara aseptis pada media didalam LAF. Botol kultur yang telah ditanami selanjutnya diinkubasikan pada suhu $25 \pm 3^\circ \text{C}$ dengan penyinaran lampu TL 40 watt 16 jam /hari hingga tumbuh menjadi kalus.

Kalus yang tumbuh pada berbagai media pada umur tertentu dibandingkan kandungan kimianya dengan tanaman asal, menggunakan KLT. Sistem yang digunakan adalah fase diam silika gel GF 254, fase gerak kloroform-etil asetat (10:1) dan dideteksi menggunakan sinar UV 366 dan pereaksi anisaldehyda-asam sulfat.

Pengukuran keberhasilan adalah persentase cara sterilisasi, pertumbuhan eksplan dan kandungan senyawa kimia dalam kalus.

b. Cara analisis

Data dianalisis secara deskriptif

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini yang pertama dilakukan adalah pembuatan media MS padat. Media MS dibuat sendiri dengan bahan-bahan kualitas pro analisa dari Merck. Dibuat 6 (enam) macam variasi zat pengatur tumbuh (Tabel I)

Sebelum dilakukan penanaman secara KJT, terlebih dahulu dilakukan orientasi atau pemilihan waktu sterilisasi yang sesuai terhadap tanaman tersebut agar pada penanaman eksplan nanti menghasilkan pertumbuhan yang baik tanpa terganggu kontaminan. Eksplan yang berupa daun *Vitex trifolia* dicuci dibawah air mengalir selama 10 menit, kemudian direndam dalam larutan sublimat dalam beberapa kadar dan waktu yang berbeda, kemudian eksplan tersebut ditanam dalam media M3, kemudian diamati pada hari ke-5 inkubasi. Hasil yang didapatkan dapat dilihat pada Tabel II.

Tabel II. Hasil orientasi sterilisasi yang sesuai

Bahan untuk seterilisasi		Bahan pembasah		Waktu	Keterangan (n = 6)
Jenis	Kadar	Jenis	Kadar		
Larutan Sublimat	0,03 %	Tween 80	2 tts/100ml	5 menit	100%kontaminasi
	0,05%		2tts/100ml	5 menit	20% kontaminasi
	0,05%		2tts/ 100ml	7 menit	16% kontaminasi
	0,05%		2tts/100 ml	10 menit	0% kontaminasi

Dari hasil orientasi sterilisasi pada Tabel II, maka selanjutnya ditetapkan sterilisasi yang sesuai adalah larutan sublimat 0,05 % dengan bahan pembasah Tween 80 dua tetes/100 ml dan waktu perendaman eksplan sterilisasi 10 menit. Selanjutnya dilakukan kembali penanaman terhadap eksplan terhadap M1-M6

dengan cara sterilisasi yang telah ditetapkan dan didapatkan hasil seperti tercantum pada Tabel II.

Tabel III. Hasil penanaman pada media

Jenis Media	Hasil Pertumbuhan (n = 6)					
	Waktu inisiasi	Minggu ke 1	Minggu ke 2	Minggu ke 3	Minggu ke 4	Minggu ke 5
M1	± 7 hari	Mulai tumbuh kalus			Kalus siap disubkultur	
M2	± 12 hari	Mulai tumbuh kalus			Kalus mulai coklat	
M3	± 5 hari	Mulai tumbuh kalus	Pertumbuhan mulai baik			Kalus mulai coklat
M4	± 7 hari	Mulai tumbuh kalus		Kalus mulai coklat		
M5	± 7 hari	Mulai tumbuh kalus			Kalus siap disubkultur	
M6	± 7 hari	Mulai tumbuh kalus			Kalus siap disubkultur	

Dari hasil penanaman eksplan (Tabel II) terlihat bahwa kultur kalus tanaman *Vitex trifolia* mulai berinisiasi paling cepat setelah berumur 5 hari yaitu pada media M3 dan M6, inisiasi yang paling lambat terjadi pada Media M 2 yang baru mulai menunjukkan tanda-tanda tumbuh kalus pada usia kultur 12 hari.

Waktu inisiasi ialah waktu munculnya pertama kali tanda-tanda pertumbuhan kalus yang berujud tonjolan kecil berwarna tertentu pada tepi-tepi irisan eksplan atau pada permukaan perlukaan eksplan. Waktu inisiasi dinyatakan dalam satuan hari, semakin pendek waktu inisiasi semakin baik sebab berarti kultur akan lebih cepat tumbuh sehingga tidak membutuhkan waktu yang lama.

Tonjolan kecil pada tepi eksplan tersebut tumbuh kalus yang berwarna putih, dan setelah waktu tertentu kalus akan memenuhi seluruh permukaan media. Kalus dinyatakan siap disubkultur bila terdapat tanda-tanda mulai timbulnya warna coklat yang berarti kalus mulai rusak atau nutrisi pada media telah habis ditandai dengan media yang mengering atau telah pecah-pecah. Dalam penelitian ini didapatkan hasil bahwa pada media M1, M5 dan M6 pada umur kultur ± 4 minggu kalus telah tumbuh dengan baik sehingga telah memenuhi seluruh permukaan botol sehingga media menjadi pecah, dalam hal ini dianggap kalus telah siap disubkultur pada media yang sama. Media M3 yang memiliki waktu inisiasi cepat, ternyata pertumbuhan kalusnya kurang baik, kalus lambat berkembang sehingga sampai minggu ke 5, kalus belum memenuhi botol namun warnanya mulai coklat sehingga harus disubkultur meskipun media belum habis nutrisinya. Pada media M4 pada awalnya kalus tumbuh dengan baik, namun pada minggu ke 3 kalus mulai coklat sehingga harus segera disubkulturkan meskipun pertumbuhannya belum maksimal. Pemilihan sistem kultur yang sesuai didasarkan pada waktu inisiasi dan pertumbuhan kalus, hasil pengamatan waktu inisiasi yang baik diperoleh dari media M3 dan M6 tetapi pertumbuhan kalus pada media M3 kurang baik. Hasil pertumbuhan kalus yang maksimal didapat dari media M1, M5 dan M6, dan waktu inisiasi kalus media M1 dan M5 relatif lebih panjang dibandingkan media M6, sehingga media M6 dianggap yang paling sesuai.

Kalus yang didapat kemudian dikumpulkan untuk masing-masing media dan dikeringkan pada suhu 40-60 °C, suhu yang digunakan tidak terlalu tinggi dengan maksud agar tidak merusak kandungan kimia dari kalus. Selanjutnya kalus kering diserbuk dan dimaserasi dengan kloroform-metanol (1: 1). Ekstrak Kloroform-metanol yang sudah dipekatkan, ditotolkan pada lempeng Silika gel GF254, bersama dengan serbuk kering daun *Vitex trifolia*.

Lempeng kemudian dikembangkan pada bejana kromatografi dengan fase gerak kloroform-etil asetat (10:1) v/v dengan jarak rambat 9 cm, setelah lempeng kering, disemprot dengan pereaksi anisaldehyd-asam sulfat, kemudian setelah dipanaskan 100 °C selama 5 menit, diamati pada sinar tampak dan sinar UV 366 nm. Kromatogram yang didapat menunjukkan bahwa kalus berumur 5 minggu telah memiliki kandungan *Viteosin A*, hal ini ditandai dengan bercak berwarna keunguan yang memiliki Rf 0,4 sedangkan *Vitexicarpin*

(Rf 0,45 warna bercak kuning) belum diproduksi oleh kalus, hal ini dapat terjadi karena memang dalam tahapan kalus belum semua metabolit sekunder yang dikandung oleh suatu tanaman terbentuk, kemungkinan baru akan terbentuk setelah terjadi diferensiasi organ tanaman.

Hasil dari kromatogram 1 ditegaskan lagi dengan kromatogram 3 yang membandingkan antara kandungan kalus dan tanaman asal, terlihat bahwa profil kromatogram kalus mirip dengan profil kromatogram tanaman asal, hanya beberapa bercak saja yang tidak dimiliki kalus, seperti disebutkan tadi, hal ini kemungkinan karena memang belum terbentuk dalam tahapan kalus. Selanjutnya dilakukan KLT terhadap masing-masing kalus MI-M6 untuk melihat apakah perbedaan kadar zpt akan berpengaruh terhadap profil kromatografi kalus.

Dari hasil kromatogram 3 terlihat bahwa profil kromatogram M1-M6 tidak berbeda, hal ini menunjukkan bahwa kombinasi zpt tidak berpengaruh secara kualitatif terhadap kandungan kimia tanaman *Vitex trifolia*, namun demikian masih perlu diteliti secara kuantitatif apakah ada perbedaan kadar antara masing-masing media.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa sterilisasi yang paling sesuai untuk daun *Vitex trifolia* adalah memakai sublimat 0,05% selama 10 menit

Kombinasi zpt yang paling sesuai untuk penumbuh kalus dari eksplan daun *Vitex trifolia* adalah 2,4 D 1 mg/L + kinetin 1mg/L.

Kromatogram komponen kimia kalus tidak dipengaruhi oleh zat penumbuh, dan profilnya tidak berbeda nyata dengan kromatogram tanaman asli.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 1995, *Materia Medika Indonesia*, jilid V, 510-511, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta.
- Gemini Alam, Subagus W., Ibnu G.G., Lukman H., H. Timmerman., 1999, Isolasi & Identifikasi senyawa Trakheopasmolitik dari Daun *Vitex trifolia*, *Planta Medica*, Submitted cit Subagus W., 2001, Peranan Fitokimia dalam Penemuan Obat baru, *Makalah Seminar Sehari Peranan Produk Alam Dalam Penemuan Obat Baru*, Yogyakarta.
- Heyne, K., 1987, *Tumbuhan Berguna Indonesia III*, diterjemahkan oleh badan Litbang Kehutanan Jakarta, 1680-1, Penerbit Yayasan Sarana Wana Jaya, Jakarta.
- Indrayanto G., 1988, *Pendahuluan*, dalam Indrayanto G (Ed), *Kultur Jaringan Tanaman Suatu Petunjuk Praktis Untuk Bidang Farmasi*, 1, PAU Bioteknologi UGM, Yogyakarta.