

PENGGUNAAN THIDIAZURON, 2, 4 – D DAN GIBERELLIN DALAM PEMBENTUKAN EMBRIO SOMATIK PULE PANDAK (*Rauwolfia serpentina* (L.) Benth. ex Kurz) MELALUI KULTUR *in vitro*

(*The Use of Thidiazuron, 2, 4 - D and Giberellin in Formation of Somatic embryo of Rauwolfia serpentina* (L.) Benth. ex Kurz by *in vitro* culture¹⁾)

HERU SUGITO¹⁾, YANTO SANTOSA²⁾, EDHI SANDRA³⁾

¹⁾ Program Magister Profesi Konservasi Biodiversitas Sekolah Pascasarjana IPB, Bogor 16680

²⁾ Lab. Ekologi Satwaliar Dept. KSH Fakultas Kehutanan IPB, Bogor 16680

³⁾ Lab. Konservasi Tumbuhan Dept. KSH Fakultas Kehutanan IPB, Bogor 16680

Diterima 10 Februari 2006 / Disetujui 29 Maret 2006

ABSTRACT

Rauwolfia serpentina (L.) Benth. ex Kurz, is one of the tropical forest plant species which is exploited as plant medicine and pertained as world rareness. To be able to make balance to storey, level request of *Rauwolfia serpentina* (L.) Benth. ex Kurz simplisia raw material and saving it from destruction, require to be by activity of conservation, one of the effort by *in vitro* culture forming of somatic embryo. Somatic embryo by *in vitro* is forming of embryo from cell is non sexual which is culture. Somatic embryo application beside for the of quickly, also can be yielded by the amount of seed which is not limited its amount, as well as to support program repair of crop. This research to know giving influence and regulator dose grow, consist of 2 attempt. I. Factorial Attempt which use completely randomized experimental disign, what consist of 2 factor, first is thidiazuron concentration which consist of 4 level, that is 0 ppm 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, second is concentration 2, 4-D which consist of 4 level, that is 0 ppm, 0.5 ppm, 1 ppm, 1.5 ppm, 2 ppm .II. Factorial Attempt which use completely randomized experimental disign, what consist of 2 factor, first is thidiazuron concentration which consist of 4 level, that is 0 ppm, 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, second is giberellin concentration which consist of 4 level, that is 0 ppm, 0.5 ppm, 1 ppm, 1.5 ppm, 2.0 ppm. Pursuant to manner statistical analysis result is non parametric Kruskal-Wallis to callus score and embryo at 14 day after initiation not there are difference between treatment, but 28 and 42 day after initiation there are difference between treatment. The use thidiazuron + 2,4-D give, forming of somatic embryo with the best treatment (6 ppm Thidiazuron + 0,5 ppm 2, 4 D). Growth of embryo happened at age 35 day after initiation. Thidiazuron + giberellin forming of callus only.

Key word : *Rauwolfia serpentina*, thidiazuron, 2,4-D, giberellin, somatic embryo

PENDAHULUAN

Pule pandak (*Rauwolfia serpentina* (L.) Benth. ex Kurz) merupakan salah satu spesies tumbuhan hutan tropika yang dimanfaatkan sebagai tumbuhan obat. Heyne (1987) menyatakan tanaman tersebut digunakan secara tradisional, sebagai obat untuk sesak nafas, nyeri perut, murus, sakit kepala dan gigitan ular, demam, tekanan darah tinggi, digigit ular, disentri, kolera, perut mulas, kehilangan selera makan, nyeri rahim, radang usus buntu dan lain-lain.

Saat ini kebutuhan bahan baku simplisia pule pandak masih dipenuhi dari hasil pemanenan langsung dari alam. Disisi lain kebutuhan bahan baku simplisia pule pandak baik dalam negeri maupun dari negara-negara industri farmasi, terus meningkat dan belum terpenuhi. Pemanfaatan tumbuhan obat ini diambil bagian akarnya dan dipanen hanya mengandalkan dari alam. Hal ini dikhawatirkan akan terjadi kekurangan suplai bahan baku dan bahkan terjadi kepunahan. Untuk dapat mengimbangi tingkat permintaan

bahan baku simplisia pule pandak dan menyelamatkannya dari kepunahan, perlu dilakukan kegiatan konservasi. Untuk itu maka perlu produksi bibit secara masal dan terjamin kelestariannya. Salah satu upaya adalah melalui kultur *in vitro*, dengan pembentukan embrio somatik.

Salah satu faktor yang mempengaruhi pembentukan embrio somatik adalah jenis dan komposisi zat pengatur tumbuh. Thidiazuron merupakan kelompok sitokinin yang sangat kuat untuk pembentukan pucuk, 2, 4 – D merupakan kelompok auksin untuk pembentukan akar dan giberellin merupakan hormon yang bersifat memicu dormansi. Dari kombinasi zat pengatur tumbuh thidiazuron + 2, 4 – D atau kombinasi thidiazuron + giberellin diharapkan dapat terjadi pembentukan embrio somatik untuk pule pandak.

Penelitian ini bertujuan mendapatkan dosis terbaik kombinasi thidiazuron + 2, 4 – D dan kombinasi thidiazuron + giberellin dalam pembentukan embrio somatik pule pandak melalui kultur *in vitro*.

METODE PENELITIAN

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan Pusat Pengembangan Penataran Guru Pertanian Cianjur, mulai September sampai November 2005.

Bahan penelitian yang digunakan antara lain: eksplan pule pandak yang berasal dari planlet koleksi Laboratorium Kultur Jaringan Fakultas Kehutanan IPB. Senyawa atau unsur penyusun media Murashige and Skoog (MS) meliputi unsur hara makro, unsur hara mikro, vitamin, gula, agar-agar dan zat pengatur tumbuh (thidiazuron, 2, 4 – D, giberellin), aquades dan bahan sterilisasi

Peralatan yang digunakan adalah timbangan analitik, laminar air flow cabinet, disekting set, sprayer, lampu spirtus, autoklaf, pH meter, peralatan gelas, hot plate magnetik stirer dan botol kultur sebanyak 500 botol.

Penelitian ini terdiri dari 2 percobaan yaitu:

1. Pengaruh Kombinasi Thidiazuron + 2, 4 – D terhadap Pembentukan Embrio somatik Pule pandak

Percobaan dilakukan dalam rancangan faktorial dalam pola acak lengkap dengan ulangan sebanyak masing-masing 5 kali, dengan kombinasi zat pengatur tumbuh Thidiazuron yaitu 0 ppm (T_0); 2 ppm (T_1); 4 ppm (T_2); 6 ppm (T_3) dan 8 ppm (T_4) dengan 2, 4 – D yaitu 0 ppm (D_0); 0,5 ppm (D_1); 1,0 ppm (D_2); 1,5 ppm (D_3) dan 2,0 ppm (D_4).

2. Pengaruh Kombinasi Thidiazuron + Giberellin terhadap Pembentukan Embrio somatik Pule pandak

Percobaan dilakukan dalam rancangan faktorial dalam pola acak lengkap dengan ulangan sebanyak masing-masing 5 kali, dengan kombinasi zat pengatur tumbuh thidiazuron yaitu 0 ppm (T_0); 2 ppm (T_1); 4 ppm (T_2); 6 ppm (T_3) dan 8 ppm (T_4) dengan giberellin yaitu 0 ppm (G_0); 0,5 ppm (G_1); 1,0 ppm (G_2); 1,5 ppm (G_3) dan 2,0 ppm (G_4).

Sebelum pembuatan media, semua alat harus dalam keadaan steril. Media yang digunakan untuk induksi embrio somatik adalah media Murashige and Skoog yang ditambahkan dengan sukrosa 30 g/l, thidiazuron, 2, 4 – D, giberellin sesuai perlakuan. Dalam pembuatan media, langkah pertama adalah pembuatan larutan stok yang meliputi stok hara makro, stok hara mikro, stok $Fe-EDTA$, stok vitamin dan stok zat pengatur tumbuh.

Media diatur pada pH 5,5 – 5,8, kemudian menggunakan pematat agar 8 gr/l sambil dipanaskan hingga mendekati mendidih, kemudian dibagi-bagi dalam botol kultur sebanyak 25 ml tiap botol dan ditutup dengan menggunakan penutup plastik. Setelah itu media disterilkan dengan menggunakan autoklave dengan suhu 121°C selama 30 menit.

Bahan tanam diambil dari eksplan pule pandak yang berasal dari Laboratorium Kultur Jaringan Fakultas

Kehutanan IPB. Tunas dari planlet yang terbentuk dipotong-potong pada bagian yang sama dalam kondisi aseptik selanjutnya eksplan siap diisolasi. Kultur disimpan di dalam ruangan temperatur 25°C, cahaya menggunakan lampu neon.

Pertumbuhan eksplan diamati dari saat isolasi dengan interval pengamatan 14 Hari Setelah Inisiasi (HSI) dengan peubah sebagai berikut :

1. Pertumbuhan Eksplan (dinyatakan dalam skor)
Skor 1 = Eksplan hidup, tetapi tidak membentuk kalus
Skor 2 = Eksplan membentuk sedikit kalus
Skor 3 = Eksplan membentuk kalus yang sedang
Skor 4 = Eksplan membentuk kalus yang melimpah
Skor 5 = Eksplan membentuk kalus dan planlet
Skor 6 = Eksplan membentuk embrio.
2. Kecepatan terbentuknya kalus/embrio dan warna kalus/embrio dilakukan secara visual mulai awal terbentuknya kalus sampai terbentuknya embrio.

Untuk mengetahui pengaruh perlakuan yang dicobakan terhadap data yang menggunakan skor, dianalisis dengan menggunakan statistik non parametrik Kruskal – Wallis (Siegel, 1992).

Rumus yang digunakan adalah sebagai berikut :

$$h = \frac{2}{N(N+1)} \sum_{j=1}^k \frac{R_j^2}{n_j} - 3(N+1)$$

dimana :

- k : banyak sampel
- n_j : banyak kasus dalam sampel ke-j
- N : banyak kasus dalam sampel.

Data pengamatan percobaan disajikan dengan tabel, histogram dan foto.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh Kombinasi Thidiazuron + 2, 4 – D terhadap Pembentukan Embrio somatik pule pandak

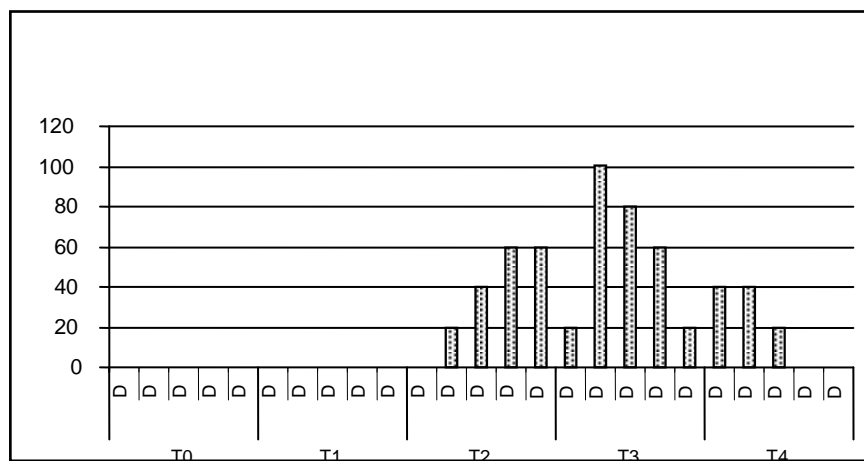
Hasil analisis Kruskal – Wallis terhadap skor pertumbuhan eksplan pada pengamatan 14 hari HSI menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan antar perlakuan. Hal ini disebabkan eksplan masih menyesuaikan dengan media yang baru sehingga belum menampakkan pengaruh perlakuan. Pada pengamatan 28 HSI dan 42 HSI menunjukkan bahwa ada perbedaan antar perlakuan, karena eksplan sudah menyesuaikan dengan media yang baru. Pada saat itu kondisi eksplan sudah normal, teratur, terbentuklah kalus, dan susunan hormon dirubah sehingga sebagian besar dari sel-sel tersebut mulai memisah dan berubah bentuk menjadi embryoid, dan hanya menunggu untuk dibebaskan

untuk menjadi embrio, tidak menjadi akar atau tunas. Sel-sel kalus yang berubah bentuk menyerupai embrio dinamakan embrio somatik (Ammirato 1992).

Hasil pengamatan secara visual menunjukkan bahwa kombinasi Thidiazuron + 2, 4 - D terjadi pembentukan embrio. Hal ini berarti bahwa pule pandak mempunyai respon membentuk embrio pada perlakuan thidiazuron + 2, 4 - D karena thidiazuron merupakan jenis sitokinin yang paling kuat untuk pembelahan sel yang kemudian dikombinasikan dengan jenis auksin 2, 4 - D yang merangsang pembesaran sel. Komposisi media dan pemilihan zat pengatur tumbuh yang sesuai selain mendorong terbentuknya kalus juga mendorong terbentuknya embriogenesis.

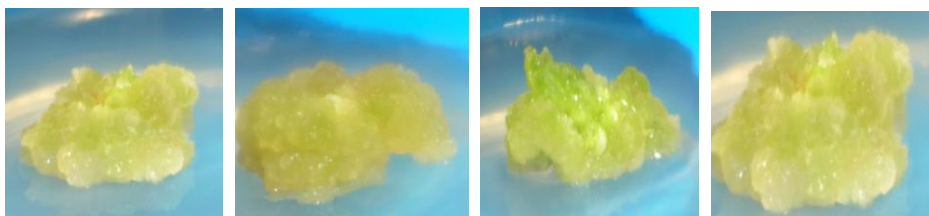
Saat pembentukan embrio pada masing-masing perlakuan tidak sama. Tingkat kecepatan pembentukan embrio dari eksplan, dalam teknik kultur jaringan erat hubungannya dengan zat pengatur tumbuh. Laju pertumbuhan yang cepat dihasilkan dengan ketersediaan zat

pengatur tumbuh menyatakan bahwa dengan mengatur komposisi zat pengatur tumbuh terjadi seleksi sel-sel yang mempunyai karakter tertentu. Hal ini berarti bahwa zat pengatur tumbuh menentukan komposisi embrio yang tumbuh. Untuk tanaman jati embriogenesis terjadi setelah tujuh kali mengalami sub kultur, sementara untuk percobaan ini satu kali sub kultur sudah terjadi pembentukan embrio somatik. Hal ini merupakan suatu yang luar biasa karena diduga eksplan berasal dari planlet yang kondisinya sudah normal dan viabilitasnya tinggi. George dan Sherrington (1984) juga menyatakan bahwa adanya zat pengatur tumbuh yang mendukung akan menyebabkan terjadinya pembelahan dan pengembangan sel sedikit demi sedikit yang mengakibatkan terbentuknya embrio di atas permukaan eksplan. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa perlakuan kombinasi 6 ppm thidiazuron + 0,5 ppm 2, 4 - D memberikan persentase pembentukan embrio tertinggi (100%) (Gambar 1).



Gambar 1. Pengaruh thidiazuron + 2,4 - D terhadap persentase pembentukan embrio.

Embrio yang terbentuk dengan menggunakan thidiazuron dan 2, 4 - D dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Embrio yang terbentuk pada media thidiazuron + 2, 4 - D, a). T₄D₀, b). T₂D₃, c). T₃D₂, d). T₃D₁.

Menurut Wareing dan Philips (1970 dalam Abidin, 1982), didalam tanaman terdapat 2 fase pertumbuhan yaitu fase pembelahan dan fase pembesaran sel. Pada fase pembelahan zat pengatur tumbuh yang berperan adalah sitokinin, selanjutnya sel akan mengalami pembesaran yang distimulir oleh auksin. Menurut Watimena *et al.* (1992) auksin dalam konsentrasi rendah akan menstimulir pembesaran dan perpanjangan sel setelah terjadinya pembelahan sel yang distimulir oleh sitokinin, namun efek penghambat dan pendorong proses pembelahan sel oleh sitokinin tergantung pada hormon yang lain terutama auksin. Menurut Ammirato (1982) konsentrasi optimal dari zat pengatur tumbuh untuk embrio somatik berbeda-beda dan sifatnya spesifik untuk setiap genotip tanaman.

Pengamatan terhadap perkembangan dan pertumbuhan eksplan menunjukkan bahwa 7 Hari Setelah Isolasi (HSI),

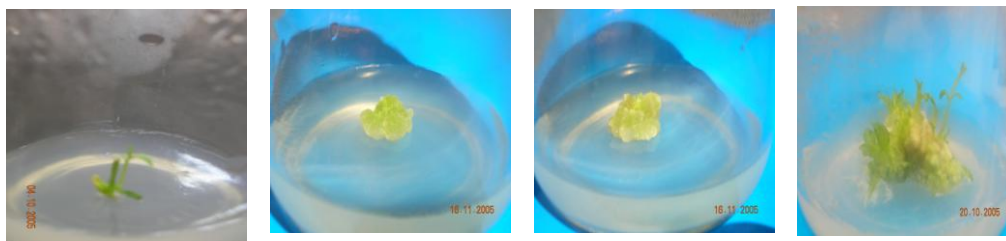
eksplan mulai membengkak dan warna berubah dari hijau menjadi hijau kecoklatan. Warna kecoklatan ini diduga karena pengaruh senyawa-senyawa hasil proses oksidasi fenol di dalam eksplan. Di tempat ini terdapat bintik-bintik yang kemudian berubah menjadi kerut-kerut pada hari ke 10 pertumbuhan kalus dimulai dari sini. Dari hasil pengamatan terhadap kecepatan terbentuknya kalus dan persentase pembentukan kalus perlakuan dengan menggunakan thidiazuron + 2, 4 - D yang paling cepat. Perlakuan kombinasi thidiazuron dan 2, 4 - D memberikan saat inisiasi kalus 10 - 20 HSI, sedangkan kombinasi thidiazuron dan giberellin kalus terbentuk sekitar 25 - 40 HSI. Kecepatan terbentuknya kalus dan warna kalus dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Pengaruh zat pengatur tumbuh terhadap kecepatan terbentuknya kalus dan warna kalus.

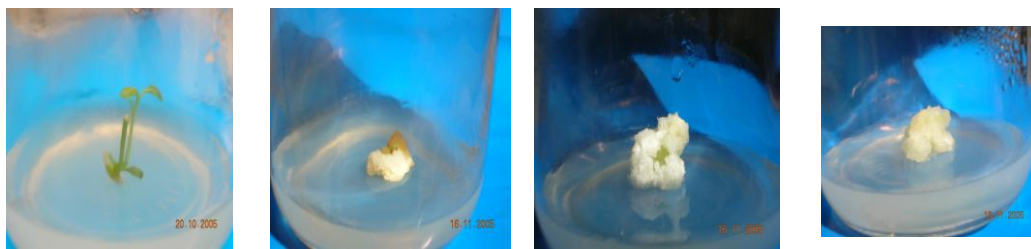
Perlakuan	Kecepatan Terbentuknya Kalus (HSI)	Warna
Thidiazuron + 2,4 -D	10 - 20	Hijau, dan agak putih kekuningan, agak padat.
Thidiazuron + Giberellin	25 - 40	Putih, remah

Secara visual tampak bahwa perlakuan kombinasi thidiazuron + 2, 4 -D menghasilkan pertumbuhan kalus yang lebih baik dibanding perlakuan kombinasi thidiazuron

+ giberellin. Bentuk dan struktur kalus dari kedua perlakuan disajikan pada Gambar 3 dan Gambar 4.



Gambar 3. Bentuk dan struktur kalus dari media thidiazuron + 2, 4 - D.



Gambar 4. Bentuk dan struktur kalus dari media thidiazuron + giberellin.

Abidin (1982), menyatakan bahwa didalam tanaman, zat pengatur tumbuh tidak bekerja sendiri-sendiri, tetapi bekerja secara berinteraksi. Thidiazuron kadang-kadang diperlukan bersama-sama 2, 4 – D untuk mendapatkan kalus yang baik sehingga dapat membentuk embrio.

Menurut Ammirato (1982), kebutuhan thidiazuron dalam kultur jaringan tanaman berbeda-beda. Pengaruh konsentrasi auksin dan sitokinin terhadap pertumbuhan dan perkembangan tergantung jenis tanamannya.

Media tanam yang digunakan dalam kultur jaringan sangat berpengaruh terhadap metabolisme sel. Pada umumnya media diperkaya dengan zat pengatur tumbuh. Zat pengatur tumbuh merupakan komponen media *in vitro* yang sangat penting kehadirannya.

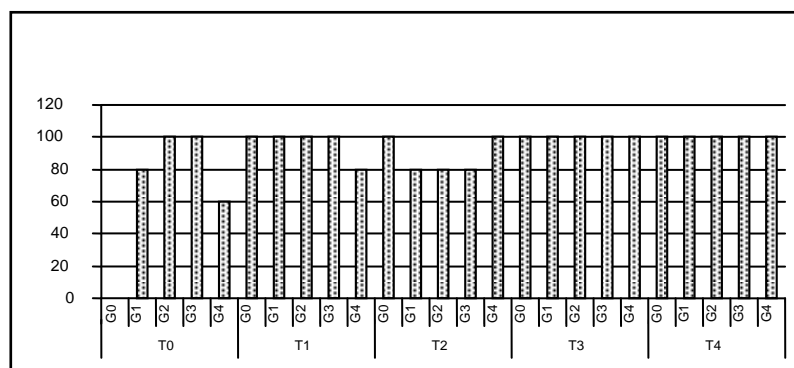
George dan Sherrington (1984), menyatakan bahwa pemberian 2, 4 – D adalah untuk merangsang pembelahan dan pembesaran sel. Penambahan auksin dalam jumlah besar cenderung menyebabkan terjadinya pertumbuhan kalus dari eksplan dan menghambat regenerasi tanaman.

Pengaruh Kombinasi Thidiazuron + Giberellin Terhadap Pembentukan Embrio somatik pule pandak

Hasil analisis Kruskal – Wallis terhadap perkembangan eksplan mulai 14 HSI menunjukkan tidak adanya

pengaruh perlakuan, tetapi pada 28 HSI dan 42 HSI menunjukkan adanya pengaruh perlakuan. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa kombinasi thidiazuron + giberellin tidak membentuk embrio, tetapi eksplan membentuk kalus. Hal ini disebabkan kombinasi zat pengatur tumbuh yang diberikan tidak mendukung terjadinya pembelahan dan pengembangan sel sehingga tidak terbentuknya embrio di atas permukaan eksplan. Warna dan struktur kalus juga mempengaruhi. Munculnya kalus yang berwarna putih dan berstruktur remah, diduga menghambat pem-bentukan embrio. Santoso (2002) menyatakan pemberian giberellin yang dibarengi dengan sitokinin dalam konsentrasi yang sama akan mendorong morfogenesis yang normal tetapi kadang malah menghambat.

Untuk perlakuan thidiazuron dan giberellin persentase pembentukan kalus tertinggi dihasilkan oleh perlakuan : 0 ppm thidiazuron + 1 ppm giberellin, 0 ppm thidiazuron + 1,5 ppm giberellin, 0 ppm thidiazuron + 2 ppm giberellin, 2 ppm thidiazuron + 0 ppm giberellin, 2 ppm thidiazuron + 0,5 ppm giberellin, 2 ppm thidiazuron + 1,5 ppm giberellin, 4ppm thidiazuron + 0 ppm giberellin, yaitu 100% pembentukan kalus (Gambar 5).



Gambar 5. Pengaruh thidiazuron + giberellin terhadap persentase pembentukan kalus

KESIMPULAN

- 1) Kombinasi zat pengatur tumbuh thidiazuron + 2, 4 – D menghasilkan pembentukan embrio dengan perlakuan terbaik pada T₃D₁ (6 ppm thidiazuron + 0,5 ppm 2, 4 – D) dengan pertumbuhan embrio pada umur 35 Hari Setelah Inisiasi.
- 2) kombinasi zat pengatur tumbuh thidiazuron + giberellin tidak menghasilkan pembentukan embrio, tetapi hanya menghasilkan pembentukan kalus.
- 3) Perlakuan tanpa menggunakan zat pengatur tumbuh tidak menghasilkan kalus dan embrio.

DAFTAR PUSTAKA

- Abidin Z. 1982. Dasar-dasar Pengetahuan Tentang Zat Pengatur Tumbuh. Bandung. Angkasa.
- Ammirato. 1992. Embryogenesis in Evan, Sharp, Ammirato and Yamada. 1984. Technique for Propagation and Breeding. Hand Book of Plant Cell Culture. Macmillan. New York. Publishing Company.
- George EF & PD Sherrington. 1984. *Plant Propagation by Tissue Culture*. England: Exegetics Ltd. Eversley Basingstoke, Hants

Heyne K. 1987. *Tumbuhan Berguna Indonesia*. Jakarta. Yayasan Sarana Wanajaya.

Siegel Sidney. 1992. *Statistik Non Parametrik Untuk Ilmu-ilmu Sosial*. Jakarta. P.T. Gramedia.

Santoso U. & N. Fatimah. 2002. *Kultur Jaringan Tanaman*. Malang. Universitas Muhammadiyah Malang.

Wattimena GA, LW Gunawan, NA Mattjik, E Syamsudin, NMA Wiendi & A Ernawati. 1992. *Bioteknologi Tanaman*. Lab Kul-Jar Tan, PAU. Bioteknologi. Bogor. Institut Pertanian Bogor.