

KK
Dis M 20/03
Mur
P

DISERTASI

PERKEMBANGAN SEL PENGHASIL MINYAK ATSIRI PADA KALUS TEMU GIRING (*Curcuma heyneana* Val. & van Zijp)



ENDANG KARTINI ARIATI MURWANI

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2003**

**PERKEMBANGAN SEL PENGHASIL MINYAK ATSIRI
PADA KALUS TEMU GIRING
(*Curcuma heyneana* Val. & van Zijp)**

DISERTASI

**Untuk memperoleh Gelar Doktor
dalam Program Studi Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga
Telah dipertahankan di hadapan
Panitia Ujian Doktor Terbuka
Pada hari : Kamis
Tanggal : 13 Pebruari 2003
Pukul 10.00 WIB**

Oleh :

ENDANG KARTINI ARIATI MURWANI
NIM. 099612344 D

**DISERTASI INI TELAH DISETUJUI
TANGGAL 22 FEBRUARI 2003**

**Oleh:
Promotor**



**Prof. Dr. H. Bambang Soekardjo, S.U, Apt.
NIP 130 355 370**

Kopromotor I



**Prof. H. Sutiman B. Sumitro, S.U. D.Sc
NIP 130 809 123**

Kopromotor II


**Prof. Dr. Ami Soewandi, JS, Apt
NIP 130 531 781**

UCAPAN TERIMA KASIH

Petama-tama saya panjatkan puji syukur ke hadirat Allah yang Maha Pengasih dan Penyayang atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga disertasi ini dapat diselesaikan.

Terima kasih yang tak terhingga dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya ucapkan kepada Prof. Dr. H. Bambang Soekardjo, S.U., Apt. sebagai promotor yang dengan penuh perhatian telah memberikan dorongan, bimbingan dan saran, serta kritik untuk memperbaiki disertasi ini.

Demikian pula saya ucapkan terima kasih yang tiada tara kepada Prof. H. Sutiman Bambang Sumitro, S.U. D.Sc. dan Prof. Dr. Ami Soewandi, JS. Apt. sebagai kopromotor yang dengan penuh kesabaran dan ketekunan membimbing, mendorong, memberi arahan dalam menyelesaikan disertasi ini.

Dengan selesainya disertasi ini, perkenankan saya mengucapkan terima kasih kepada:

Pemerintah Republik Indonesia yang telah memberikan bea siswa melalui program TMPD untuk meringankan beban saya dalam menyelesaikan disertasi ini.

Prof. Dr. Puruhito, dr sebagai Rektor Universitas Airlangga saat ini, Prof. H. Bambang Rahino Setokusumo, dr dan Prof. Soedarto. dr, DTM & H, Ph. D. sebagai para mantan Rektor UNAIR atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan selama mengikuti Program Pascasarjana di Universitas Airlangga ini.



Prof. Dr. H. Muhammad Amin, dr, Sp.P, selaku direktur Program Pasca-sarjana Universitas Airlangga dan Prof. Dr, M. Soedijono, dr, DSTHT mantan direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga atas kesempatan yang diberikan untuk menjadi mahasiswa Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Ketua Program Studi Program Doktor bidang MIPA Prof. Dr. Gde Nyoman Astika, Apt. dan mantan Ketua Program Studi Program Doktor bidang MIPA Prof. Dr. H. A. Aziz Hubeis, Apt., yang telah memberikan saran dan kritik serta masukan yang sangat berharga untuk penyelesaian disertasi ini.

Prof. Soemadi, Drs. Apt., Prof. Dr. Tatik Wardiyati Ir. M.S. dan Prof. Dr. A. Duran Corebima, M.Pd., Prof. H. A. Soeparmo, Drs., M.Sc. dan Retno Mastuti, Ir., MAgr. D.Agr., Dr. Siswandono, M.S. Apt., Dr Purwanto, Apt, Dr. Mangestuti Agil, Apt, M.S., Prof. Dr. Hanafi Muljohardjono, dr., Prof Mustahdi Surjoatmodjo, drh, M.Sc. selaku penguji proposal dan disertasi.

Kepada seluruh staf dosen Program Pascasarjana Universitas Airlangga, Prof. H.A. Soeparmo, Drs, MSc., Prof Soemadi, drs, Apt., Prof. H Abdoelbasyir, Drs. (alm.), Prof. H. Soetandyo Wignyosoebroto, MPA., Prof. Dr. H. Koento Wibisono, Prof. Dr. Sarmanu, drh., Prof. Dr. H.M. Zainudin, Apt., Prof. Dr. Susanti Linuwih, Prof. Dr. Ami Soewandi J.s. Apt., Dr. Widodo, Dr. Harjana Apt.

Rektor Universitas Negeri Malang (UM) beserta seluruh jajarannya. Dekan FMIPA dan segenap jajarannya, Ketua Jurusan Biologi FMIPA dan Kepala Laboratorium Biologi Universitas Negeri Malang yang telah memberikan fasilitas untuk menyelesaikan disertasi ini.

Hadi Margono, Drs. Kepala Laboratorium Kultur Jaringan Tumbuhan Universitas Negeri Malang yang dengan sabar dan tekun membimbing dalam pengumpulan data untuk menyelesaikan disertasi ini.

Dr. Tutuk Budiati, MS, Apt., Dr. Soewarso, M.S., dan Dr. Sudjarwo, MS yang selalu memberikan semangat dalam menyelesaikan disertasi ini.

Kepala Balai Penelitian Tanaman Obat Tawangmangu yang telah memberikan bahan untuk penelitian.

Pada kesempatan ini tak lupa pula saya ucapkan terima kasih kepada teman-teman jurusan Biologi, Kimia, dan Fisika Universitas Negeri Malang dan Universitas Brawijaya yang sangat membantu dengan memberikan fasilitas dan penelitian untuk disertasi ini.

Terima kasih yang tidak terhingga saya ucapkan kepada kedua orang tua saya. Bapak Djarot Hadisubroto alm. dan Ibu Sri Djaetun yang telah mengasuh saya sampai saya mencapai pendidikan tertinggi ini.

Demikian pada adik-adik saya Sudarmadji Hery Sutrisno, Drs, Ak, MSc., Djoko Sulisty., Drs, MS, Satrio Wibowo, Drs, Ak, MBA, Endang Kunti Erowati, Dra dan Sapto Dewo, SE yang telah memberikan dorongan dan bantuan finansial untuk menyelesaikan disertasi ini.

Para mantan mahasiswa dan mahasiswa yang membantu mengerjakan penelitian ini di laboratorium dan pengetikan sehingga disertasi ini dapat terselesaikan.

Semua sahabat yang tidak mungkin dapat disebutkan satu persatu yang telah memberikan dorongan moral selama penelitian ini. Semoga amal beliau-beliau diterima oleh Allah SWT dan mendapatkan balasan yang sesuai.

ABSTRACT

Research on the development of volatile oil cell in *Curcuma heyneana* Val. and Van Zijp callus had been carried out for studying the effect of media, plant growth regulators, and sucrose concentrations on the development of volatile oil cell produced by callus of *Curcuma heyneana* Val. and Van Zijp.

The exploratory research obtained that the full strength Murashige Skoog (MS) basal medium added naftalenic acetid acid (NAA) 5 mg/l, benzyl amino purine (BAP) 0,5 mg/l and sucrose 30 g/l is the best medium for callus induction. It was shown by the fact that callus grown in that medium showed a good proliferation and volatile oil droplet in many cells among the callus cells.

The full scale research with sucrose variation in the same basal medium MS added the same growth regulator that was done in exploratory experiment showed that in 20 g/l sucrose concentrations, the callus failed to form amyllum grains or volatile oil cell even six weeks after inoculation. Callus grown in 30 g/l sucrose produced amyllum grain in second week and then volatile oil in the third week. Visualization of the volatile oil is carried out by light and flourescent microscope. The Volatile oil reacted with Sudan III 0,1% in alcoholic solution appeared in red color by light microscope. It brightened up among the blue cells if it observed with flourescent microscope using BV-2A filter. The cell component in a callus consist of cells containing amyllum grains, oil droplet and both of them respectively. So it suggested that the callus is not a homogeneous mass but more indicated being organized system. Giberelic Acid (GA_3) added in exploratory research medium induce embryo somatic development in both solid and liquid media. More over the tracheary element could be found in developing callus. The volatile oil precursor cell was also found in the heart stage embryo. So GA_3 is supposed to promote organized growth to the callus.

Key words : *Curcuma heyneana* Val. and Van Zijp. Callus culture, volatile oil cell. Cell differentiation

RINGKASAN

Metabolit sekunder seperti minyak atsiri belum banyak diteliti lewat kultur kalus. Keberhasilan penelitian tentang pembentukan minyak atsiri masih rendah karena pada umumnya pembentukan minyak atsiri sejalan dengan diferensiasi sel, jaringan atau organ. Minyak atsiri pada temu giring (*Curcuma heyneana* Val. & Van Zijp) terdapat dalam sel yang berwarna kuning dikelilingi sel-sel parenkima. Bentuk sel minyak atsiri mirip dengan sel parenkima. Perkembangan sel minyak atsiri dalam kalus temu giring mungkin dapat diikuti lewat kultur kalus. Penelitian tentang perkembangan sel minyak atsiri dalam kalus temu giring dapat digunakan sebagai dasar untuk penelitian serupa pada tanaman lain. Jika penelitian ini berhasil dapat memberikan prospek untuk produksi minyak atsiri melalui kultur kalus.

Penelitian ini menggunakan rancangan deskriptif observasional dalam 2 tahap. Tahap 1 merupakan penelitian eksploratorik dan tahap 2 penelitian skala penuh. Tahap eksploratorik dilakukan untuk seleksi eksplan, medium induksi, dan pertumbuhan kalus. Penelitian dengan skala penuh dilakukan untuk mengetahui pengaruh kadar sukrosa dan asam giberelat terhadap perkembangan sel minyak atsiri pada temu giring. Untuk identifikasi sel minyak atsiri digunakan reagen sudan III dalam alkohol yang akan berwarna merah pada minyak atsiri. Pengamatan memakai mikroskop cahaya (Labophot 2) dan mikroskop fluoresen dengan filter biru BV-2A dan hijau G2A. Selanjutnya mengetahui pertumbuhan kalus dilakukan penimbangan berat basah kalus.

Dari penelitian eksploratorik ditemukan bahwa untuk menghasilkan kalus harus menggunakan eksplan kalus. Eksplan yang berasal dari planlet selalu menghasilkan kalus dan planlet. Medium untuk induksi kalus dan medium pemeliharaan kalus sama yaitu medium A. Pertambahan berat kalus pada medium B dan C tidak menunjukkan perbedaan yang nyata secara statistik. Medium A merupakan medium terpilih karena dapat menghasilkan minyak atsiri paling cepat dibandingkan media B dan C.

Penelitian skala penuh yang menggunakan kadar sukrosa 20 g/l (Medium D), 30 g/l (Medium A), dan 40 g/l (Medium E) menunjukkan bahwa pertambahan berat basah kalus tidak nyata secara statistik. Pembentukan butir amilum terjadi pada minggu ke-2 untuk medium A dan E. Pada medium D sampai 6 minggu tidak terbentuk butir amilum dalam kalus. Pada minggu ke-3 mulai terbentuk minyak atsiri dalam kalus yang tumbuh pada medium A dan E. Komposisi klaus ternyata tidak homogen parenkimatik tetapi terdiri dari sel parenkima, sel yang mengandung butir amilum, sel minyak atsiri dan sel yang mengandung butir amilum dan minyak atsiri. Selain itu tampak juga ada sel trakea dan sel serabut. Penambahan asam giberelat 5mg/l pada medium A memacu pertumbuhan embrio somatik dan perkembangan elemen trakea.

Kesimpulan dalam penelitian ini masa kalus yang secara morfologis homogen dan tidak terorganisir ternyata sangat heterogen dan tampak merupakan sistem terorganisir yang homeostatis. Masih perlu dicermati perkembangan sel minyak atsiri dalam kalus temu giring dengan mengubah komposisi zat pengatur tumbuh dalam medium.

DAFTAR ISI

| | Halaman |
|--|---------|
| Sampul Depan..... | |
| Sampul Dalam | i |
| Prasyarat Gelar | ii |
| Persetujuan | iii |
| | |
| Ucapan Terima Kasih | v |
| Abstract | viii |
| Ringkasan | ix |
| DAFTAR ISI | x |
| DAFTAR TABEL | xii |
| DAFTAR GAMBAR | xiii |
| DAFTAR LAMPIRAN | xv |
| | |
| BAB I PENDAHULUAN | 1 |
| 1.1 Latar Belakang Permasalahan | 1 |
| 1.2 Rumusan Masalah | 5 |
| 1.3 Tujuan Penelitian | 6 |
| 1.4 Manfaat Penelitian | 7 |
| | |
| BAB II TINJAUAN PUSTAKA | 8 |
| A Landasan Teoritik | 8 |
| 2.1 Metabolit Sekunder..... | 8 |
| 2.2 Kalus dan Perkembangannya | 13 |
| 2.3 Faktor-faktor yang mempengaruhi pertumbuhan kalus | 18 |
| 2.3.1 Medium kultur | 18 |
| 2.3.2 Zat pengatur tumbuh | 21 |
| 2.4 Interaksi medium, sinar, kadar gula dalam memacu pembentukan metabolit sekunder oleh kalus | 25 |
| 2.5 Diferensiasi Sel | 26 |
| B. Landasan Empirik | 27 |
| | |
| BAB III KERANGKA KONSEPTUAL PENELITIAN..... | 34 |
| 3.1 Kerangka Konseptual | 34 |
| | |
| BAB IV METODE PENELITIAN | 37 |
| 4.1 Kajian eksploratorik | 37 |
| 4.1.1 Tempat Penelitian | 37 |
| 4.1.2 Rancangan Penelitian | 37 |
| 4.1.3 Tujuan Penelitian | 38 |
| 4.1.4 Alat dan Bahan | 38 |
| 4.1.5 Pelaksanaan Penelitian | 38 |

| | |
|--|-----------|
| 4.1.5.1 Seleksi eksplan temu giring untuk induksi kalus..... | 38 |
| 4.1.5.2 Seleksi media untuk pertumbuhan kalus..... | 41 |
| 4.2 Penelitian dengan Skala Penuh | 43 |
| 4.2.1 Tempat Penelitian | 43 |
| 4.2.2 Rancangan Penelitian | 43 |
| 4.2.3 Tujuan Penelitian | 43 |
| 4.2.4 Alat dan Bahan | 43 |
| 4.2.5 Pelaksanaan Penelitian | 44 |
| BAB V. HASIL PENELITIAN | 47 |
| 5.1 Hasil Penelitian Eksploratorik..... | 47 |
| 5.2 Hasil Penelitian Skala Penuh..... | 53 |
| 5.3 Analisis data | 64 |
| BAB VI PEMBAHASAN | 67 |
| 6.1 Penelitian Eksploratorik | 67 |
| 6.2 Penelitian Skala Penuh | 74 |
| BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN | 83 |
| 1 Kesimpulan | 83 |
| 2 Saran | 83 |
| DAFTAR PUSTAKA | 84 |
| LAMPIRAN | 90 |

DAFTAR TABEL

| | Halaman |
|--|---------|
| Tabel 5.1. Respon eksplan temu giring pada medium A dilihat secara makroskopis..... | 47 |
| Tabel 5.2. Hubungan antar umur kalus dan kandungan minyak atsiri dalam kalus yang tumbuh pada medium A, B, C..... | 51 |
| Tabel 5.3. Pertambahan Berat basah kalus yang berumur satu bulan yang tumbuh pada medium A, D, E ... | 53 |
| Tabel 5.4. Pengaruh kadar sukrosa dalam pembentukan minyak atsiri dan butir amilum dalam kalus yang tumbuh pada medium A, D, E..... | 54 |
| Tabel 5.5. Komposisi kalus yang berumur 1 bulan pada medium D, A, dan E..... | 55 |
| Tabel 5.6. Tabel Ringkasan analisis variansi satu arah berat basah kalus pada medium A,B dan C yang berumur 6 minggu..... | 64 |
| Tabel 5.7. Tabel ringkasan analisis variansi satu arah berat basah kalus yang berumur satu bulan yang tumbuh pada medium D, A dan E..... | 65 |
| Tabel 5.8. Hasil perhitungan Chi Square komposisi kalus berumur 1 bulan pada medium D, A, dan E | 66 |

DAFTAR GAMBAR

| | Halaman |
|--|---------|
| Gambar 2.1 Pembentukan terpena dari amilum (dari Bidwell, 1979)..... | 10 |
| Gambar 2.2 Hubungan antara beberapa jalur metabolisme dalam pembentukan metabolit sekunder (diambil dari Nugroho, 2002)..... | 11 |
| Gambar 2.3 Jalur mevalonat (A) dan GAP piruvat (B) untuk biosintesis terpenoida (diambil dari Nugroho, 2002)..... | 12 |
| Gambar 5.1. Pertumbuhan tunas temu giring pada medium A a)tunas ujung mengembung, b)tunas tengah mengembung, c) tunas pangkal membentuk planlet dan kalus..... | 48 |
| Gambar 5.2. Penampang melintang rimpang temu giring dengan larutan Sudan III dilihat dengan mikroskop labophot 2, a) sel minyak, b) sel parenkima, tanda garis menunjukkan 68 mikron..... | 49 |
| Gambar 5.3. Penampang melintang rimpang temu giring dilihat dengan mikroskop fluoresen menggunakan filter biru BV-2A, dinding sel berwarna biru muda dan minyak atsir berwarna kekuningan. Garis merah menunjukkan ukuran 12 mikron..... | 49 |
| Gambar 5.4. Penampang melintang planlet temu giring, a) bagian ujung menampakkan struktur daun, b) bagian tengah struktur pelepah, c) struktur rimpang, d) sel minyak atsiri, e) sel parenkima.. | 50 |
| Gambar 5.5. Grafik garis berat basah kalus pada medium A, B, C selama 6 minggu | 51 |
| Gambar 5.6. Pertumbuhan kalus temu giring pada medium A, B, C tidak menunjukkan perbedaan morfologi..... | 52 |
| | |
| Gambar 5.7. a) sel minyak, b) sel mengandung butir amilum, c) sel parenkima. Garis merah menunjukkan ukuran 12,5 mikron | 52 |

| | |
|--|----|
| Gambar 5.8. Pengaruh kadar sukrosa terhadap pertumbuhan kalus temu giring pada medium A, D, E | 54 |
| Gambar 5.9. Komposisi kalus temu giring a) sel parenkimatik, b) sel kalus mengandung butir amilum eksentrik, c) sel mengandung butir amilum dan minyak atsiri, d) sel yang mengandung minyak, e) sel calon trakea, f) serabut..... | 56 |
| Gambar 5.10. a) sel minyak atsiri dan amilum dilihat dengan mikroskop fluoresen filter BV-2A, b) sel minyak atsiri dilihat dengan mikroskop fuoresen dengan filter G-2A | 57 |
| Gambar 5.11. Perkembangan sel minyak atsiri dalam kalus temu giring, a) sel muda nampak mempunyai inti dan sitoplasma penuh, b) sel mengandung amilum dan minyak atsiri, dinding sel tampak rangkap vakuola terbentuk di tepi, c) minyak atsiri makin banyak dinding sel makin tebal, d) sel mengalami penuaan | 58 |
| Gambar 5.12. Pertumbuhan kalus temu giring pada medium GA padat (a) dan GA cair (b) selama 8 minggu | 59 |
| Gambar 5.13. Perkembangan sel kalus pada medium G menjadi trakea, a) calon trakea yang masih berinti, b) sel calon trakea yang berkembang dan mengandung butir amilum, c)trakea dengan penebalan bentuk jala dan lubang perforasi berekor. Garis merah menunjukkan ukuran 12,5 mikron | 60 |
| Gambar 5.14. a) sel parenkima yang mengandung butir amilum, b) embrio somatik tahap globuler, c) embrio somatik tahap jantung, d) calon sel minyak atsiri..... | 61 |
| Gambar5.15. Tunas yang tumbuh pada medium F, a) planlet b) kalus yangmengeras danberubah menjadi hijau dan coklat | 62 |

DAFTAR LAMPIRAN

| | |
|--|----|
| Lampiran 1. Komposisi Medium A, B, C, D, E, F, G | 90 |
| Lampiran 2. Hasil Analisis GC-MS untuk rimpang, kladus dan planlet temu giring | 91 |
| Lampiran 3. Hasil Analisis Data SPSS for Windows Release 6.0 | 97 |



BAB I**PENDAHULUAN****1.1 Latar Belakang Permasalahan**

Metabolit sekunder suatu senyawa yang diproduksi oleh sel atau tumbuhan jika ada kelebihan karbon untuk aktivitas metabolisme primer. Metabolisme primer meliputi pertumbuhan dan diferensiasi. Karbon tidak hanya digunakan untuk pembentukan dinding sel dan protein melainkan diubah menjadi senyawa metabolit sekunder yang disimpan dalam vakuola atau sitoplasma. Jika diperlukan karbon untuk pertumbuhan lebih lanjut maka metabolit sekunder dapat diuraikan kembali menjadi senyawa yang dibutuhkan (Collin & Edward, 1998). Metabolit sekunder bersifat spesies spesifik dan disintesis melalui jalur-jalur biogenetik tertentu. Ditinjau dari segi ekonomi metabolit sekunder yang dihasilkan oleh tumbuhan mempunyai nilai ekonomi yang tinggi karena hanya sedikit yang dipakai misalnya sebagai obat, pewangi, pembangkit selera, insektisida, dan pewarna. Minyak atsiri yang ada di pasar digunakan untuk parfum atau bumbu, untuk memperbaiki bau dan rasa makanan atau obat (Verpoorte, 2000).

Menurut Dodds and Robert (1995) metabolit sekunder yang diproduksi tumbuhan dapat disintesis oleh kultur sel. Produksi metabolit sekunder seperti minyak atsiri terbatas pada sel-sel yang mengalami spesifikasi tinggi sehingga tingkat diferensiasi berhubungan langsung dengan biosintesis minyak atsiri tersebut. Pada saat ini tingkat keberhasilan produksi mi-

nyak atsiri melalui kultur kalus masih rendah karena kebanyakan minyak atsiri dibentuk atau disimpan dalam sel atau organ khusus. Sebagai contoh kegagalan pembentukan minyak atsiri pada *Mentha sp* disebabkan tidak terbentuknya trikoma glanduler yang merupakan organ tempat penyimpanan minyak atsiri tersebut (Evans, 1989).

Suatu jaringan tumbuhan yang dikultur pada medium yang mengandung nutrisi dan hormon yang sesuai, beberapa sel penyusunnya akan distimulasi untuk membelah. Pembelahan sel tersebut tidak terbatas dan menghasilkan masa yang terdiri dari sel yang relatif tidak mengalami diferensiasi. Kumpulan sel-sel tersebut dinamakan kalus (Albert, 1983; Wetherell, 1982). Kalus dapat digunakan untuk berbagai tujuan di antaranya untuk eksplan, pembentukan metabolit sekunder seperti minyak atsiri (Thomas and Davey, 1975; Tisserat, 1985)

Pada dasarnya kalus mengandung sel-sel yang homogen, tidak mengalami diferensiasi tetapi mengandung sel kompeten yang jika mendapatkan rangsang tertentu akan menjadi sel khusus atau sel prekursor yang bersifat karakteristik, misalnya sel minyak atsiri. Dengan demikian terjadi seleksi sel kompeten untuk menjadi sel prekursor. Seleksi ini biasanya dikoordinasi sehingga sel yang telah mengalami diferensiasi mempunyai pola penyebaran yang karakteristik. Sebagai contoh adanya penyebaran sel spesifik yang mempunyai jarak tertentu antara sel spesifik satu dengan sel lain yang sejenis (Sachs, 1987 dalam Larkin et al, 1997). Kalus yang muncul dari pembelahan sel berbagai jaringan somatik jika dikultur dapat membentuk kalus baru atau organ, bahkan planlet sesuai

dengan medium dan zat pengatur tumbuh yang digunakan untuk kultur (Yeoman, 1986; Pierik, 1987). Penggunaan kultur in vitro untuk penelitian tentang metabolit sekunder lebih disukai daripada penggunaan tumbuhan intak. Kultur sel memungkinkan deteksi yang lebih sederhana dan mudah untuk memodifikasi kondisi eksperimen (Luckner, et al., 1977).

Dalam kultur in vitro untuk mendapatkan kalus perlu diperhatikan eksplan yang digunakan. Eksplan tersebut harus mengandung sel hidup atau jaringan yang masih muda dengan sebagian besar sel-selnya aktif membelah sehingga responsif untuk program inisiasi kalus (Collins and Edward, 1998). Selain eksplan, medium juga sangat berperan dalam pertumbuhan kalus. Jika belum diketahui medium yang sesuai dapat dilakukan variasi makronutrien dari medium MS sehingga dapat digunakan medium MS penuh, $\frac{1}{2}$ dan $\frac{1}{4}$. Dalam kultur in vitro eksplan tidak melakukan fotosintesis sehingga perlu dipasok sumber karbon dari luar. Sukrosa adalah sumber karbon yang lebih disukai dalam kultur in vitro. Selain itu dapat digunakan glukosa atau fruktosa tetapi glukosa lebih efektif dibandingkan fruktosa (Torres, 1989; Pierik, 1987; Dodds dan Robert, 1995; Collins, 1998). Menurut Dodds dan Robert (1995) hampir semua kultur in vitro memberikan respons pertumbuhan yang optimum jika menggunakan sukrosa sebagai sumber karbon sedangkan disakarida atau monosakarida yang lain memberikan pertumbuhan yang kurang baik kualitasnya, dan dapat menimbulkan variasi. Selain itu sukrosa merupakan molekul yang mudah larut dalam air, tidak menghambat biosintesis meskipun dalam kadar yang tinggi, muatan listrik netral, tidak bersifat reduktor, dan tidak

bereaksi dengan gugus fungsional yang lain. Sukrosa dapat ditransport secara simplas atau apoplas (Lea and Leegood, 1993).

Zat pengatur tumbuh diperlukan juga dalam pembentukan metabolit sekunder sebagai contoh NAA dapat menaikkan kadar minyak atsiri jika diberikan pada tumbuhan *Mentha piperita* dewasa. Giberelin (GA_3) yang disemprotkan pada bunga *Humulus lupulus* dapat menaikkan kadar resin dalam hop yang dihasilkan oleh tanaman tersebut, tetapi menurunkan kadar minyak atsiri pada *Mentha piperita* karena mengurangi pembentukan trikoma glanduler. Sitokinin dapat menghambat proses penuaan sel dan menaikkan kadar kafein dari tanaman kopi (*Coffea sp*). Selain itu dapat juga menaikkan kadar liosin pada *Duboisia* (dalam Evans, 1989).

Temu giring (*Curcuma heyneana* Val. Van Zijp) merupakan tanaman yang menghasilkan minyak atsiri. Bagian tanaman yang menghasilkan minyak atsiri paling banyak adalah rimpangnya (Darwis, dkk., 1991; Syamsuhidayat dan Hutapea, 1991, Setiawati, 1986; Hidayati, 1989). Kadar minyak atsiri dalam rimpang temu giring sekitar 1,5%. Secara mikroskopik minyak atsiri terdapat dalam sel-sel kortek rimpang temu giring. Bentuk sel minyak atsiri bulat atau lonjong berwarna kuning dan dikelilingi oleh sel-sel parenkima (Anonim, 1989). Sel minyak atsiri mirip dengan sel minyak lemak, dapat bereaksi dengan sudan III dan memberikan warna merah yang mudah dikenali secara mikroskopik (Evans, 1989).

Penelitian yang pernah dilakukan^{Kafin (1995)} terhadap budidaya in vitro temu giring (*Curcuma heyneana* Val. Van Zijp) dan temu lawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) menunjukkan bahwa eksplan tunas rimpang temu giring

dan temu lawak dapat menghasilkan planlet jika dikultur pada media MS (Murashige Skoog, 1962) dan RT (Revised Tobacco), tanpa penambahan zat pengatur tumbuh. Akar dan pangkal tunas yang dikultur pada medium MS yang ditambah 2,4 D (asam diklorofenoksi) 1 – 5 mg/ l dapat menghasilkan kalus tetapi pertumbuhannya sangat lambat (Kartini, 1995). Selanjutnya dilakukan penelitian tentang embriosomatik dan aklimatisasi *Curcuma heyneana* Val. & van Zijp sebagai penghasil terpenoida oleh Margono dan Kartini (1996). Dari penelitian tersebut ditemukan bahwa medium MS dengan penambahan NAA (asam naftalenat) 5mg/ l dan BAP (Benzil amino purin) 0,5 mg/l dapat menginduksi kalus temu giring. Kendala yang cukup besar adalah sterilisasi eksplan sehingga belum didapat kalus yang konsisten.

Dari uraian tersebut di atas belum ada uraian atau pengamatan tentang perkembangan sel penghasil minyak atsiri pada temu giring. Mengingat pembentukan minyak atsiri pada temu giring mungkin sejalan dengan diferensiasi maka perlu dipelajari perkembangan sel penghasil minyak atsiri melalui kultur kalus.

1.2 Rumusan Masalah

Dari latar belakang permasalahan yang telah diuraikan di atas dapat dirumuskan beberapa masalah sebagai berikut:

1. Apakah kalus temu giring merupakan struktur homogen parenkimatik?
2. Komposisi medium yang mana dapat digunakan untuk menginduksi kalus Temu giring?

3. Apakah sukrosa merupakan prekursor minyak atsiri pada kalus temu giring?
4. Kapan waktu pembentukan sel minyak atsiri pada kalus temu giring?
5. Apakah sel minyak atsiri dalam kalus temu giring akan menghasilkan sel minyak atsiri yang lebih banyak?
6. Apakah penambahan asam giberelat dapat mempercepat pembentukan minyak atsiri pada kalus temu giring?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan umum

Penelitian ini ditujukan untuk mengamati perkembangan sel minyak atsiri pada kalus temu giring.

1.3.2 Tujuan khusus

1. Mengamati komposisi kalus temu giring.
2. Mendapatkan komposisi medium yang sesuai untuk menginduksi pembentukan kalus pada temu giring.
3. Membuktikan bahwa sukrosa dapat digunakan sebagai prekursor minyak atsiri dalam kalus temu giring.
4. Menetapkan perkembangan sel minyak atsiri dalam kalus temu giring.
5. Mengamati pertumbuhan kalus yang mengandung minyak atsiri.
6. Melihat pengaruh asam giberelat dalam pembentukan sel minyak atsiri pada temu giring.

1.4 Manfaat Penelitian

Jika penelitian ini berhasil dapat digunakan sebagai landasan penelitian tentang pembentukan sel minyak atsiri pada tumbuhan yang lain. Di samping itu penelitian ini mempunyai prospek untuk produksi minyak atsiri temu giring melalui kultur in vitro.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Landasan Teoritik

2.1 Metabolit Sekunder

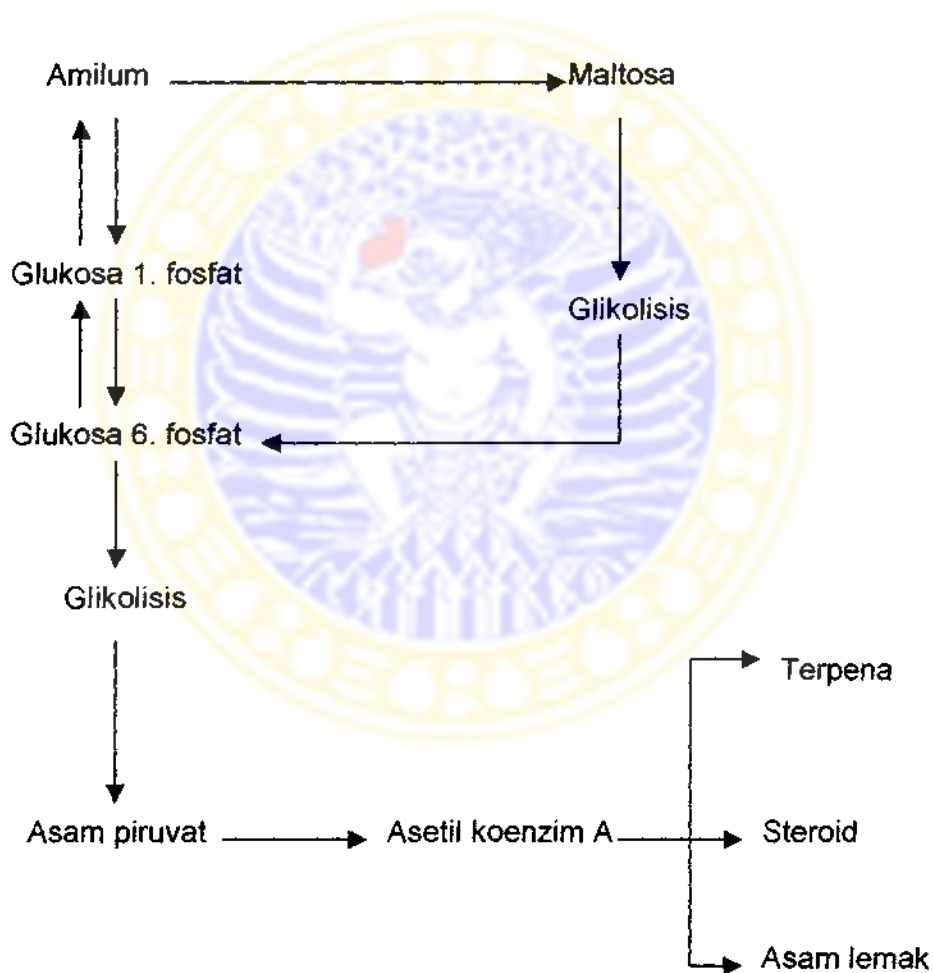
Metabolit sekunder adalah senyawa yang dihasilkan oleh suatu spesies atau genus tertentu yang mungkin hanya diproduksi pada tingkat pertumbuhan dan perkembangan tertentu. Selain itu metabolit sekunder dapat diproduksi pada saat tanaman mengalami stres yang disebabkan oleh adanya perlukaan atau serangan mikroorganisme (Verpoorte, 2000). Kemungkinan lain metabolit sekunder dibentuk pada saat stress karena kekurangan air. Senyawa yang terbentuk pada saat stres di antaranya sesquiterpena bisiklik, steroida, resin dan lain-lain (Evans, 1989). Minyak atsiri juga merupakan salah satu metabolit sekunder yang dihasilkan tanaman (Evans, 1989; Dodds & Robert, 1995).

Menurut Dodds & Robert (1995) metabolit sekunder yang dihasilkan oleh tanaman yang hidup dapat juga disintesis oleh kultur sel. Dalam kultur *in vitro* jalur sintesis metabolit sekunder ada beberapa macam, yaitu: (a) pembentukan yang tidak berhubungan dengan sitodiferensiasi misalnya pembentukan fitosterol dan flavonoid tertentu, (b) senyawa yang tersebar luas dalam tubuh tanaman dan terbatas pada sel yang khusus misalnya lignin dan tanin, (c) senyawa yang terbatas pada familia dan spesies tertentu meskipun biosintesisnya tidak bergantung pada sitodiferensiasi misal flavonoid spesifik dan antraknon, (d) senyawa yang biosin-

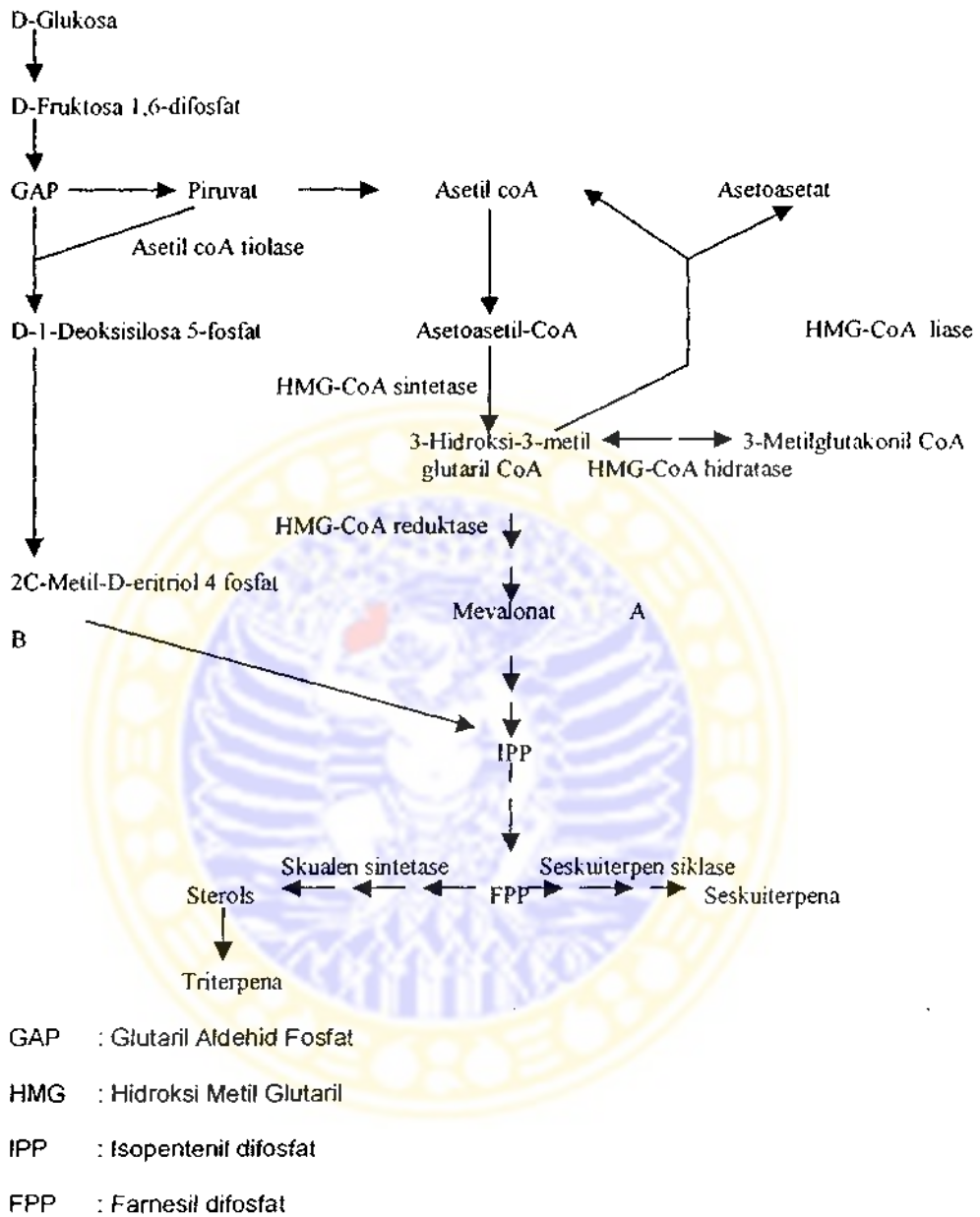
tesisnya terbatas pada sel atau jaringan yang sudah mengalami spesialisasi tinggi, misal: latex, minyak atsiri, dan resin. Pembentukan senyawa-senyawa tersebut berhubungan erat dengan sitodiferensiasi. Dalam kultur *in vitro* jalur biosintesis metabolit sekunder dapat tetap atau berubah sehingga metabolit yang dihasilkan mungkin tetap, bertambah, atau berkurang jenisnya dibandingkan dengan metabolit sekunder yang dihasilkan oleh tanaman induk yang hidup (Verpoorte, 2000; Evans, 1989).

Pendekatan yang digunakan untuk mengetahui jalur biosintesis metabolit sekunder yang telah dilakukan adalah dengan jalan menambah prekursor metabolit sekunder pada media kultur yang digunakan. Kebanyakan penelitian dengan penambahan prekursor berhasil meningkatkan produksi metabolit sekunder. Kegagalan mungkin terjadi berhubungan dengan terjadinya pengendapan, konjugasi, atau tidak terjadi penyerapan prekursor, bahkan mungkin ada perubahan jalur biosintesis karena tidak adanya enzim yang mengkatalisis pembentukan metabolit sekunder tersebut (Dodds & Robert, 1995; Evans, 1989). Kebanyakan minyak atsiri mengandung senyawa terpenoida tetapi mungkin juga mengandung aldehida, keton, alkohol atau senyawa fenol. Minyak atsiri dapat ditemukan dalam suatu kelenjar atau buluh yang terdapat pada seluruh tubuh atau bagian tertentu dari tumbuhan (Simpson and Ogorzaly, 1986). Demikian juga minyak atsiri yang terdapat dalam beberapa spesies yang termasuk anggota Zingiberaceae banyak mengandung terpenoid (Simpson and Ogorzaly, 1986; Evans, 1989; Purseglove, 1985).

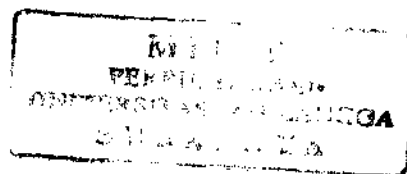
Menurut pendapat Bidwell (1979) jalur biosintesis terpenoida dapat melalui amilum yang dihidrolisis menjadi glukosa yang selanjutnya bersenyawa dengan ion fosfat menjadi glukosa 1. Fos-fat kemudian glukosa 6.fosfat yang selanjutnya mengalami glikolisis menjadi asam piruvat lalu membentuk asetil koenzim A menjadi terpena, steroid, atau asam lemak. Untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada skema di bawah ini.



Gambar 2.1 Pembentukan terpena dari amilum (dari Bidwell, 1979)



Gambar 2.3 Jalur mevalonat (A) dan GAP piruvat (B) untuk biosintesis terpenoida (diambil dari Nugroho, 2002)



Berhubung pembentukan minyak atsiri yang mengandung terpenoida berkaitan langsung dengan sitodiferensiasi maka kultur kalus dapat digunakan untuk mempelajari pembentukan minyak atsiri atau sel minyak atsiri pada temu giring.

2.2 Kalus dan Perkembangannya

Potongan tubuh tumbuhan jika ditanam dalam medium yang sesuai akan menghasilkan kalus. Kalus merupakan hasil pertumbuhan yang tidak terorganisasi, biasanya mengandung sel-sel parenkima yang berdinding tipis (Pierik, 1987). Kalus merupakan bagian dari tumbuhan yang paling homogen dibanding dengan komponen seluruh tubuh tumbuhan. Kalus muncul sebagai respons adanya perlukaan yang kemudian tumbuh menjadi besar. Sebagai respons terhadap perlukaan pembelahan sel lambat dan terbatas pada daerah perlukaan tetapi aktivitas metabolik bertambah, misalnya terjadinya proses pembentukan polifenol untuk memperkuat dinding sel supaya sel terlindung dari patogen. Selain itu mungkin diproduksi enzima yang dapat melarutkan dinding sel jamur. Respons berikutnya adalah terjadinya pembelahan sel yang cepat sehingga kalus bertambah besar. Dalam pertambahan besar kalus diperlukan tambahan auksin dari luar (Stafford & Warren, 1993).

Pertumbuhan dan perkembangan kalus yang muncul dari eksplan melalui tiga tahap yaitu: induksi, pembelahan sel, dan diferensiasi. Selama fase induksi metabolisme dipacu untuk aktifitas pembelahan sel.

Berlangsungnya fase induksi tergantung pada status fisiologis dan tahap perkembangan eksplan serta kesesuaian kondisi kultur. Dalam tahap pembelahan sel, sel-sel eksplan berubah menjadi meristematik kembali. Selanjutnya setelah sel bertambah banyak akan berlangsung tahap diferensiasi. Dengan demikian pertumbuhan kalus sangat tergantung pada eksplan, medium pertumbuhan, zat pengatur tumbuh dan kondisi lingkungan (Dodds and Robert, 1995; Sadhu, 1989). Jika eksplan mengandung sel-sel yang sudah mengalami diferensiasi, sebelum membelah harus diubah statusnya menjadi sel yang dediferensiasi dulu, sehingga hasil pembelahannya dapat berupa kalus yang bersifat parenkimatik (Halperin, 1969 dalam Pierik, 1989).

Jaringan kalus pada prinsipnya merupakan kumpulan sel yang belum dan sudah mengalami diferensiasi dan merupakan jaringan yang tidak terorganisasi (Pierik, 1989). Dari sifat-sifat jaringan kalus di atas, maka kalus dapat digunakan untuk berbagai tujuan, misalnya : sebagai eksplan, sumber protoplas untuk kultur protoplas atau diuraikan menjadi sel-sel bebas untuk kultur sel (Thomas dan Davey, 1975; Tisserat, 1985).

Pada tumbuhan yang termasuk monokotil untuk menginduksi kalus diperlukan adanya stimulasi hormonal, karena monokotil sukar untuk membentuk kalus. Zat pengatur tumbuh yang diperlukan adalah auksin saja (Pierik, 1989). Biasanya monokotil tidak menunjukkan respons yang nyata terhadap sitokinin dan memerlukan hormon auksin yang potensial seperti 2,4 D dalam konsentrasi tinggi untuk melakukan pertumbuhan dan

perkembangan dalam kultur jaringan (Gresshof, 1978; Harms, 1982 dalam Yeoman, 1986).

Kalus mungkin dapat diperoleh dari berbagai bagian tubuh tumbuhan (Sadhu, 1989; Evans et al.,1981 dalam Yeoman 1986; Yeoman and Mcleod, 1977), tetapi jaringan yang lebih muda lebih mudah menghasilkan kalus karena lebih reaktif. Sifat kalus tergantung dari jaringan yang menghasilkannya dan komposisi medium yang digunakan untuk menginduksi serta medium pemeliharaan kalus tersebut. Komposisi dan struktur kalus mungkin akan berubah selama dilakukan beberapa kali subkultur, karena adanya sel-sel tertentu yang dominan pertumbuhannya selama subkultur (Yeoman, 1986).

Setelah kalus tumbuh perlu dilakukan subkultur, karena pertumbuhan pada medium yang sama dalam waktu yang terlalu lama akan menurunkan kadar nutrisi dan penguraian zat pengental dalam medium, serta hasil metabolisme yang dikeluarkan oleh kalus ke dalam medium dapat bersifat toksis. Sebaiknya subkultur dilakukan selama 2-6 minggu pada medium agar dengan suhu 25° C (Dodds and Roberts, 1995; Collin and Edwards, 1998; Pierik, 1989). Untuk pemeliharaan kalus diperlukan protein dalam medium, Protein yang sering digunakan adalah glisin, arginin atau campuran asam amino yang terdapat dalam hidrolisat kasein (Torres, 1989). Selain itu pada waktu pemindahan ke dalam medium baru untuk pemeliharaan kalus harap diperhatikan ukuran kalus jangan terlalu kecil supaya tetap hidup (Dodds and Roberts, 1995). Menurut (Collin and

Edwards (1998) dan Street (1969) sebaiknya ukuran kalus (diameter) berkisar 5 – 10 mm dan beratnya 20 – 100 mg atau 0,3 cm³ volumenya (Stafford & Edwards, 1993). Subkultur biasanya dilakukan setiap 4 – 6 minggu untuk kalus yang dipelihara dalam medium agar pada suhu 25° C. Sebaiknya kalus yang disubkultur adalah kalus yang friabel (remah) dan nampak bercahaya. Kalus yang berwarna coklat atau yang mengandung jaringan yang mati disisihkan (Collin and Edwards, 1998; Dodds and Robert, 1986).

Menurut Sadhu (1989) stimulasi pembelahan sel dan pembentukan kalus seringkali terjadi sebagai akibat faktor endogen dan eksogen. Heterogenitas dapat muncul dari variasi yang diturunkan atau adanya perubahan genetik dan sitologik yang dipengaruhi oleh kondisi kultur. Selain itu metode pemeliharaan dan subkultur kalus juga berpengaruh terhadap heterogenitas kalus (Collin and Edwards, 1998). Dengan lebih banyak sifat heterogenitas dari kalus memungkinkan penggunaan yang lebih luas dari kalus. Jika heterogenitas kalus rendah turunan yang terjadi lebih banyak yang mirip dengan induknya (Yeoman, 1986).

Kalus dapat tumbuh dan bertambah besar volumenya jika disubkultur dan dipelihara dalam medium padat (Torres, 1989; George dan Sherrington, 1984). Kalus tersusun dari sel-sel yang tidak sama. Jika tidak berasal dari eksplan yang mengandung sel meristematik maka kalus yang dihasilkan akan mempunyai variasi yang tidak persis sama dengan induknya. Pertumbuhan kalus dapat diukur dari berat basah kalus, berat

kering kalus, jumlah kandungan protein dan DNA seluler, kumpulan sel (masa sel), dan indeks mitosis, serta laju respirasinya (Torres, 1989; Stafford & Edwards, 1993). Kalus dalam bentuk gumpalan lebih mudah membentuk jaringan yang dediferensiasi (Pierik, 1989).

Kalus yang tumbuh dari eksplan kadang-kadang lunak dan rapuh atau keras dan mungkin nampak seperti benjolan. Kalus pada bawang merah (*Allium cepa*) nampak bercahaya karena mengandung lendir. Beberapa kalus berwarna kuning kecoklatan meskipun diinkubasi di ruang gelap atau dalam ruang yang disinari dengan kekuatan 2000 lux. Ada juga kalus yang mengandung klorofil atau karotenoida di dalam plastidnya, bahkan mungkin juga terdapat antosianin di dalam vakuola sel-sel penyusunnya, jika kalus tersebut diinkubasi di ruang yang diberi sinar (Thomas and Davey, 1985). Menurut Yamamoto, Mizuguchi, dan Yamada dalam Dodds (1995) kadang-kadang kalus yang tumbuh berstruktur keras karena mengandung lignin, atau rapuh sehingga mudah pecah. Kalus mungkin mengalami pigmentasi sehingga berwarna kuning, hijau, putih atau ungu karena mengandung antosianin. Pigmentasi kemungkinan merata atau hanya pada sel-sel tertentu saja.

Kalus jika dilihat dengan mikroskop cahaya menunjukkan adanya bagian yang terdiri atas sel-sel meristematik. Pada *Ranunculus scleratus*, sel meristematik terdapat di daerah periferi, sedang pada bawang merah sel meristematik nampak tersebar. Biasanya sel yang dihasilkan oleh jaringan meristematik tetap parenkimatik dan bervakuola, tetapi kadang-

kadang berdiferensiasi menjadi sel yang mirip floem atau sel yang mengandung lignin membentuk trakeida (Thomas and Davey, 1985). Suatu kalus yang homogen parenkimatik jarang ditemukan kecuali pada *Agave* dan *Rosa*. Sitodiferensiasi dapat membentuk: elemen trakeida, elemen buluh tapis, sel gabus, sel sklerotik, dan trikoma (Dodds and Roberts, 1995).

Ultra struktur kalus menunjukkan bahwa sel – sel penyusun kalus pada fase stasioner mempunyai vakuola sentral dengan sitoplasma yang tipis di bawah dinding sel dan jumlah organel yang paling sedikit dibanding dengan sel yang sedang tumbuh. Setelah sel mengalami pertumbuhan vakuola mengecil karena terjadi penambahan sitoplasma dan jumlah organel (Thomas and Davey, 1985).

2.3 Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Pertumbuhan Kalus

Faktor-faktor yang mempengaruhi pertumbuhan kalus di antaranya medium, pH, dan osmotika, zat pengatur tumbuh serta penyinaran.

2.3.1 Medium kultur

Dalam tubuh tumbuhan terdapat metabolit yang mobil. Jika metabolit tersebut jumlahnya cukup maka akan terjadi pertumbuhan. Medium dibuat berdasarkan prinsip tersebut di atas karena akan membuat sel yang terisolasi dari tubuh tumbuhan mampu tumbuh dalam medium tersebut (Yeoman, 1986).

Makanan yang diperlukan oleh berbagai tumbuhan berbeda-beda, meskipun komponen dasar semua media kultur jaringan mengandung garam anorganik (unsur makro dan mikro), karbohidrat, vitamin, zat pengatur tumbuh, agar dan air. Berbagai ekstrak tumbuhan seperti ekstrak yeast, air kelapa, kadang-kadang ditambahkan dalam medium untuk menaikkan respons pertumbuhan (Sadhu, 1989; Wetherell, 1982).

Medium MS (Murashige and Skoog, 1962) paling sering digunakan sebagai medium dasar. Beberapa tanaman tertentu memerlukan modifikasi zat-zat penyusun komposisi medium dasar sesuai dengan kebutuhan masing-masing tanaman. Modifikasi dapat dilakukan pada unsur makro dan mikro, vitamin, protein atau sukrosa yang digunakan dalam kultur (Yeoman, 1986). Untuk pertumbuhan kalus diperlukan kalium dalam bentuk KCl atau KNO_3 30 mM (Torres, 1989). Kalium diperlukan untuk aktivator beberapa enzima, untuk gerak dan perubahan turgor pada sel penutup stoma dan sel pulvinus daun serta tangkai daun. Amonium sebagai sumber nitrogen untuk pembentukan asam nukleat dan protein, pigmen, koenzima, metabolit sekunder (Street & Opik, 1984).

Menurut konsistensinya medium ada yang: cair, padat dan setengah cair. Ketiga medium tersebut digunakan sesuai dengan tujuan yang ingin dicapai dalam kultur jaringan. Medium padat paling sering digunakan untuk menginduksi kalus dan organogenesis. Medium ini mempunyai kelemahan, karena hanya bagian eksplan yang menempel pada medium yang mendapat makanan dan kemungkinan bagian tersebut melakukan

pertukaran gas, dan zat-zat toksik antara eksplan dan medium. Dengan demikian ada perbedaan kecepatan pertumbuhan antara eksplan yang menempel pada medium dan pada bagian eksplan yang lain (Stafford & Warren, 1993).

Dalam medium cair dengan penggojogan memungkinkan pertumbuhan yang lebih bebas dan dapat menghilangkan polarisasi. Semua permukaan eksplan dalam medium cair dapat bersentuhan dengan medium, sehingga terjadi pertumbuhan merata ke segala arah. Kelemahan medium ini dapat menyebabkan pembusukan jika tidak dilakukan penggojogan terus menerus (Briggs et al., 1974). Medium setengah cair lebih memudahkan pengambilan makanan bagi eksplan, sehingga mungkin juga membantu pertumbuhannya (Torres, 1989).

Jika belum diketahui dengan pasti medium yang sesuai untuk eksplan sebaiknya dilakukan penanaman eksplan dalam medium MS penuh, MS setengah, dan MS seperempat, sehingga dapat diketahui kadar mikro-nutrien dan makronutrien yang dikehendaki (Pierik, 1989). Medium yang sudah pernah digunakan untuk menumbuhkan kalus pada berbagai tumbuhan yang termasuk Zingiberaceae adalah medium dasar: Nadgauda et al., Mascarenhas et al., (1978), MS (1962), dengan pH 8 dan penambahan kinetin 0,1 mM dan BAP 0,2 mM serta 10% CM, untuk *Curcuma longa* (George et al., 1984); MS dengan 1% agar dan 3% sukrosa untuk medium pertumbuhan kalus *Zingiber officinale* (Jahe) (Charlwood et al., 1988 dalam Robins and Rhodes, 1988); medium MS untuk jahe (Thorpe, 1978).

2.3.2 Zat pengatur tumbuh

Zat pengatur tumbuh merupakan komponen yang paling berpengaruh dibanding dengan medium, pH dan intensitas sinar (Yeoman, 1986). Zat pengatur tumbuh adalah suatu senyawa organik selain nutrisi yang dalam jumlah kecil memacu, menghambat atau memodifikasi pertumbuhan dan perkembangan secara kualitatif. Hormon adalah zat organik selain nutrisi yang aktif dalam jumlah yang sangat sedikit ($< 1\text{mM}$, sering kali $1\ \mu\text{M}$) dan dibentuk oleh bagian tertentu dari tumbuhan serta ditranslokasi ke tempat yang lain untuk menimbulkan respons biokimia, fisiologis atau morfologis. Jadi zat pengatur tumbuh meliputi hormon dan senyawa sintetik yang dipergunakan untuk mempengaruhi pertumbuhan. Beberapa kelompok hormon yang dikenal di antaranya: auksin, giberelin, sitokinin dan asam absisat. Zat yang dapat menghambat pertumbuhan antara lain: etilen, brasinosteroid dan sebagainya (Moore, 1989).

Zat pengatur tumbuh mempunyai pengaruh yang berbeda-beda terhadap eksplan. Ada yang menstimulasi pertumbuhan kalus dan ada yang menstimulasi organogenesis secara langsung. Ada juga yang menstimulasi kalus untuk organogenesis dan membentuk planlet yang sempurna. Di samping itu efek zat pengatur tumbuh juga tergantung pada eksplan dan jenis tumbuhannya. Zat pengatur tumbuh yang sering digunakan untuk memacu pertumbuhan kalus dapat dalam bentuk tunggal maupun kombinasi, biasanya sitokinin dan auksin dalam jumlah yang se-

imbang, jika ditujukan untuk pembentukan kalus. Jika konsentrasi auksin dalam medium lebih tinggi dibandingkan dengan sitokinin akan terbentuk akar dan sebaliknya jika konsentrasi sitokinin lebih tinggi dari auksin yang terbentuk adalah tunas ujung batang (Sadhu, 1989; Wetherell, 1982; Briggs, 1974; Thomas and Davey, 1975; Pierik, 1989; Yeoman, 1983; Lea and Leegood, 1978; Grant, 1978; Dixon and Gonzales, 1993). Menurut Thorpe (1978) jika kadar auksin dalam kombinasi dengan sitokinin lebih rendah dapat menstimulasi pembentukan planlet.

Auksin sudah dapat dibuat sintesisnya dan dikelompokkan menjadi (a) asam indol, (b) asam naftalenat, (c) asam klorofenoksi, (d) asam benzoat dan (e) asam pikolinat. Dari kelompok asam indol yang sering digunakan adalah asam indol asetat (IAA) dan asam indol butirat (IBA). Kelompok asam naftalenat yang sering digunakan adalah asam naftalenat (NAA) dan asam beta naftalenat. Kelompok asam diklorofenoksi yang terkenal adalah asam 2,4 diklorofenoksi asetat (2,4 D), asam 2,4,5 trikloroasetat (2,4,5 T) dan asam 2 metil 4 klorofenoksi asetat (MPCA). Kelompok asam benzoat yang digunakan asam 2 metoksi 3,6 diklorobenzoat (dicamba) dan kelompok asam pikolinat yang digunakan adalah asam 4 amino 3,5,6 trikloropikolinat (picloram).

IAA mudah rusak karena teroksidasi oleh enzim IAA oksidase dan teroksidasi sinar. Di samping itu IAA juga inaktif jika berkonjugasi dengan gula, peptida dan asam aspartat. Selain IAA, asam indol propionat dan IBA (asam indol butirat) juga asam benzoat dan 2,4 D dapat berkonjugasi

dengan asam aspartat dan NAA dapat membentuk ester dengan gula. Akan tetapi dibanding dengan zat pengatur tumbuh yang lain 2,4 D paling sedikit mengalami kerusakan atau konjugasi. Dengan demikian 2,4 D paling banyak digunakan. Kelemahan 2,4 D adalah mempunyai sifat herbisida, banyak tanaman dikotil yang tidak tahan terhadap 2,4 D dibandingkan dengan tanaman monokotil tetapi jika dosisnya terlalu tinggi juga mematikan tanaman monokotil (Moore, 1989).

Auksin mengaktifkan gen spesifik pada tingkat transkripsi, sehingga dapat memacu sintesis protein. Auksin juga mempengaruhi pemanjangan sel pada koleoptil dan mempercepat laju pertumbuhan, auksin dapat menambah permeabilitas membran, mengubah potensial membran, mempercepat aliran plasma, mengaktifkan enzima tertentu dan memacu sintesis enzima tertentu (Moore, 1989).

Sitokinin adalah senyawa yang secara nyata menyebabkan sitokinesis. Biasanya sitokinin yang digunakan adalah kinetin (6 furfuryl aminopurin), benzil adenin (BA). Zeatin adalah sitokinin alami yang terdapat dalam biji jagung. Pada tembakau, sel empulurnya tidak dapat tumbuh, jika diletakkan dalam medium yang tidak mengandung zat pengatur tumbuh. Sel empulur tembakau yang tidak mengandung sitokinin juga tidak tumbuh, tetapi jika diletakkan dalam medium yang mengandung auksin dan sitokinin baru menampakkan pertumbuhan. Sitokinin dapat inaktif jika dioksidasi oleh sitokinin oksidase atau berkonjugasi dengan

glukosa atau metiltiol, tetapi sifat ini reversibel sehingga dapat untuk mengontrol aktivitas sitokinin (Moore, 1989).

Kombinasi antara auksin dan sitokinin merupakan pengontrol pembentukan elemen trakeal secara *in vivo* dan *in vitro* (Fukuda, 1992 & Aloni, 1995 dalam Fukuda, 1997). Sitokinin menambah diferensiasi elemen trakeal (Fukuda, 1997).

Giberelin (GA) memacu aktivitas pembelahan sel subapikal meristem dan menambah pemanjangan sel tetapi tidak berpengaruh terhadap pertumbuhan sel dewasa sedang auksin dapat memacu pemanjangan sel dewasa tidak tergantung ada tidaknya meristem (Kende & Zeeval, 1997). Dalam embrio GA mungkin menginduksi enzima amilase yang menghidrolisis amilum menjadi gula (Street & Opik, 1984).

Giberelin (GA) menginisiasi berbagai sintesis enzima hidrolitik dan proteolitik pada waktu biji berkecambah. Selain itu GA dapat memperpanjang meristem subapikal pada ruas-ruas batang yang masih muda. Kerja auksin dan GA bersifat komplementer.

Pada penelitian ini GA digunakan untuk pembentukan metabolit sekunder. Pengaruh GA terhadap pembentukan meristem apikal terhadap beberapa tanaman misal *Humulus lupulus* (hop), pemberian GA mempercepat pemasakan hop dan menaikkan produksi hop sampai 40 % tetapi kadar α -resin hanya 1,8% sedangkan kadar α -resin kontrol 10,2%. Pada *Mentha piperita* pemberian GA menghambat pembentukan trikoma glanduler sehingga produksi minyak atsirinya berkurang. Pengaruh GA terha-

dapat beberapa tumbuhan seperti *Chenopodium ambrosioides* dan *Anethum sp* dapat menaikkan kadar ascaridol pada dosis tertentu. Selain itu juga dapat menaikkan kandungan minyak atsiri sampai 33 - 50% (Evans, 1989).

2.4 Interaksi Medium, Sinar, Kadar Gula dalam Memacu Pembentukan Metabolit Sekunder Oleh Kalus.

Pembentukan metabolit sekunder oleh kalus bersifat fotoautotrof, sehingga mampu melakukan metabolisme seperti induknya. Pada proses fotosintesis yang umum dilakukan tumbuhan (*in vitro*) pertama kali dibentuk metabolit primer yang berupa gula. Dari metabolit primer melalui jalan biogenetik tertentu akan dibentuk metabolit sekunder. Metabolit sekunder pada Zingiberaceae pada umumnya berupa oleoresin yang terdapat dalam bentuk tetes-tetes minyak yang tersebar pada organ vegetatif dan reproduktif. Oleoresin berupa tetes minyak yang tidak larut dalam air, tetapi larut dalam alkohol. Oleoresin tidak mengalami saponifikasi jika diberi larutan potas dan amonia dengan volume yang sama, tetapi jika direaksikan dengan 1 % asam osmiat berwarna coklat atau hitam dan berwarna merah jika diberi larutan tingtur alkana. Biasanya oleoresin disekresikan dalam suatu ruang tertentu atau ke dalam suatu saluran (Claus *et al.*, 1970).

2.5 Difererensiasi Sel

Dalam pengalaman hidupnya suatu sel mengalami pertumbuhan dan perkembangan. Sel mula-mula membelah kemudian membesar dan mengalami diferensiasi. Diferensiasi tidak hanya dalam arti morfologi tetapi juga dalam status fisiologi atau biokimiawi (Burges, 1985). Diferensiasi secara morfologi berhubungan dengan bentuk, ukuran dan perubahan komponen dan struktur dinding sel yang terikat oleh adanya bentuk-bentuk penebalan khusus misal pada trakea (Greulah, 1973). Pada proses diferensiasi selain terjadi proses perubahan bentuk juga terjadi perubahan isi sel baik komponen sel yang hidup seperti organel maupun kandungan metabolit sekundernya (Evans, 1989). Secara teoritik sel yang sudah mengalami diferensiasi akan kehilangan kemampuan untuk membelah. Proses ini disebut diferensiasi ireversibel. Sebagai contoh adalah sel buluh tapis, sel trakeal dan sel gabus. Semua sel yang masih mempunyai inti pada tingkat tertentu masih dapat dirangsang untuk rediferensiasi jika ada kesesuaian rangsang (Fahn, 1990; Esau, 1977). Diferensiasi sel dapat dipengaruhi oleh hormon karena hormon mempengaruhi aktivitas enzima tertentu yang menentukan jalur diferensiasi (Esau, 1977). Setelah diferensiasi akan terjadi spesialisasi yang diikuti oleh penuaan. Dalam proses penuaan terjadi pembongkaran isi sel oleh organ atau sel lain (Penel & Lamb, 1997)

Setelah sel mengalami proses diferensiasi akan mengalami program kematian. Kematian diperlukan untuk mengganti organ tubuh dan

penggantian bentuk (Swanson & Webster, 1980). Selain itu program kematian untuk pengaman terhadap pertumbuhan tak terkendali (Albert, et al., 1983). Suatu sel yang mengalami program kematian akan mengalami perubahan dinding sekunder kemudian kehilangan inti dan sitoplasma. Pada tumbuhan pembentukan elemen trakeida merupakan salah satu tanda proses kematian sel.

B. Landasan Empirik

Sudah banyak dilakukan penelitian tentang kultur kalus untuk menghasilkan metabolit sekunder seperti: alkaloid pada *Catharanthus roseus* (Manuhara, dkk, 1995); betasianin (Elliot, 1983; Guruprasad and Laloraya, 1976); glikosida misal podofilotoksin (Uden *et al.*, 1995); asam rosmarinat (Murakami *et al.*, 1998); furanon (zat yang berbau dari strawberry) oleh Zabetakis dan Holden (1996); alkaloid pada *Narcissus confusus* oleh Selles *et al.*, (1997), minyak atsiri pada jahe (Charlwood and Brown dan Robin and Rhodes, 1988); *Achillea millefolium* (Figueiredo et al., 1994). Dalam penelitian-penelitian tersebut ditunjukkan bahwa medium, zat pengatur tumbuh dan sinar serta kadar sukrosa berperan dalam pembentukan metabolit sekunder. Medium yang biasa digunakan pada penelitian di atas adalah medium dasar MS (Manuhara dkk, 1995; Zabetakis and Holden, 1996; Uden *et al.*, 1995; Murakami *et al.*, 1998., Selles *et al.*, 1997).

Pada penelitian Manuhara, dkk. (1995) digunakan medium MS ditambah IAA 1 mg/l untuk menginduksi kalus dan subkultur dilakukan satu kali setelah inkubasi 7 minggu. Penambahan sukrosa 40 g/l, BAP 4 mg/l ke dalam medium MS dapat menghasilkan alkaloid dengan kadar maksimal. Selain itu Penambahan KNO_3 dua kali normal atau KH_2PO_4 sebanyak 25% pada medium MS $\frac{1}{2}$ juga dapat menghasilkan alkaloid dengan kadar alkaloid maksimal. Penambahan triptofan sebagai prekursor vinkristin tidak dapat menginduksi pembentukan vinkristin. Menurut penelitian Whitmer, Verpoorte and Canel (1998) komposisi hormon mempengaruhi produksi alkaloid dalam tanaman *Catharanthus roseus* transgenik. Kehadiran NAA selama masa produksi akan menurunkan akumulasi alkaloid. Demikian juga 2,4 D akan mempengaruhi kapasitas suplai prekursor biosintesis sehingga menurunkan akumulasi alkaloid indol terpenoid.

Kandungan alkaloid kalus yang maksimal dalam strawberry (*Fragaria x ananasa cv Elsanta*) adalah 2,5 – dimetil 4 hidroksi – 2H – furon 3 on (DMHF) dan 2,5 – dimetil 4 metoksin – 2H – furon 3 on. Pada tahun 1996 Zabetakis dan Holden meneliti pengaruh 6 deoksi D fruktosa terhadap biotransformasi bau strawberry tersebut di atas dengan menggunakan kultur kalus dari tangkai daun *Fragaria x ananasa cv Elsanta*. Medium yang digunakan dalam penelitian adalah MS (Sigma UK) ditambah agar 1% (Sigma UK), 3,5% Sukrosa (Sigma UK), 2,22 m. mol benzil amina purin (BAP) dan 2,46 m. mol 2,4 D, sebagai medium kontrol digunakan sukrosa

dengan kadar 2,0%. Hasil penelitian menunjukkan ada kenaikan DMHF pada kalus yang diberi sukrosa 3,5%. Deteksi DMHF dengan Kromatografi Spektrum Masa (GC – MS).

Dalam penelitian Murakami et al. (1998) produksi asam rosmarinat dalam kalus akar *Hyssopus officinalis* L. yang sudah diinfeksi dengan *Agrobacterium rhizogenes*, ditanam dalam medium MS, MS ½, WP dan B5 tanpa zat pengatur tumbuh dalam keadaan gelap, pada waktu umur 7 minggu menghasilkan asam rosmarinat dengan kadar tertinggi, yaitu 8 kali kadar asam rosmarinat dalam daun tanaman induk. Di samping itu didapatkan asam litospermat B (LAB) dengan kadar paling tinggi pada minggu kedelapan setelah penanaman. Asam litospermat (LA) dicapai kadar tertinggi jika akar ditanam dalam medium MS.

Figuiredo et al., (1994) melakukan penelitian tentang komposisi minyak atsiri dari *Achillea millefolium ssp* yang berasal dari kultur suspensi sel. Ekstraksi dilakukan setelah 8-10 hari pada saat fase eksponensial terjadi. Hasilnya menunjukkan bahwa minyak atsiri yang diperoleh dari destilasi air atau destilasi dan ekstraksi secara simultan mengandung 30 komponen. Komponen tersebut antara lain: monoterpen 5 %, seskuiterpen, eugenol hampir 40 %, demetoksiensekalin dan 2 senyawa yang tidak dapat diidentifikasi sebanyak 45 % dari total minyak atsiri. Medium yang digunakan B5 padat dengan fotoperiode (2000 lux) penyinaran lampu fluoresen sepanjang hari. Analisis komposisi minyak atsiri dengan kromatografi gas (GC) dan GC-MS. Selain itu dalam medium ditambah

miglyol 812 untuk mendapatkan kadar tertinggi minyak atsiri. Hasil lain menunjukkan bahwa akumulasi metabolit sekunder terjadi pada keadaan gelap (Manthell and Smith, 1983; Brown and Charlwood, 1986 dalam Figuiredo *et al.*, 1994), tetapi dalam situasi terang ada juga komponen minyak atsiri yang naik konsentrasinya.

Penelitian tentang biotransformasi asam ferulat dan Vanililamin menjadi kapsaisin dan vanilin dalam kultur amobil cabe (*Capsicum frutescens*) telah dilakukan oleh Johnson, Ravisankar, dan Ventakarman pada tahun 1995. Kalus yang berumur 10 hari dibuat amobil dengan asam alginat (Sigma, Chemical and Co) kemudian ditambahkan 2,5 mM asam ferulat pada medium MS yang digunakan untuk kultur kalus tersebut. Di bagian lain penambahan vanililamin 2,5 mM pada medium MS yang ditanami kalus amobil dan pada percobaan berikutnya penambahan dengan 1,25 mM asam ferulat dan 1,25 mM vanililamin. Pengaruh pemberian asam ferulat dan vanililamin pada kultur sel amobil *Capsicum frutescens* dalam pembentukan kapsaisin, dihidrokapsaisin dan vanilin menunjukkan bahwa vanilin tidak dapat dideteksi pada kultur yang tidak diberi prekursor. Pemberian asam ferulat 2,5 mM menyebabkan kadar kapsaisin lebih tinggi dibanding dihidrokapsaisin. Pada hari ke 9 kapsaisin mencapai kadar maksimum, tetapi kadar dihidrokapsaisin dan vanilin sama-sama turun. Pemberian vanililamin 2,5 mM menyebabkan kadar kapsaisin maksimum pada hari ke 6, sedang dihidrokapsaisin kadarnya maksimum pada hari ke 9. Kadar vanilin tertinggi pada pemberian vanililamin terjadi pada

hari ke 6, sedang pada hari ke 9 dihidrokapsaisin mencapai kadar maksimum. Kadar vanilin tertinggi pada pemberian vanililamin terjadi pada hari ke 6, sedang pada pemberian asam ferulat kadar vanilin tertinggi pada hari ke 9. Pemakaian kombinasi 1,25 mM asam ferulat dan 1,25 mM vanilin menunjukkan kadar maksimum kapsaisin terjadi pada hari ke 3, sedangkan kadar vanilin maksimum terjadi pada hari ke 6. Penambahan asam ferulat dan vanililamin setelah 6 hari kultur menunjukkan kadar maksimum kapsaisin terjadi pada hari ke 3, sedang kadar vanilin maksimum terjadi pada hari ke 6. Penambahan asam ferulat dan vanililamin setelah 6 hari kultur menunjukkan kadar kapsaisin maksimum pada hari ke 9 dan kadar vanilin maksimum pada hari ke 12.

Penelitian yang dilakukan Soegihardjo (1987) untuk mencari kondisi yang terbaik bagi budidaya *in vitro* tanaman *Costus speciosus* menemukan bahwa dalam medium RT (Revised Tobacco) eksplan tunas yang berasal dari rimpang, langsung menghasilkan planlet meskipun ke dalam medium pertumbuhan tidak ditambahkan zat pengatur tumbuh. Selain itu respons antara eksplan tunas, biji dan rimpang berbeda dalam kondisi yang sama. Dalam medium yang sama biji dan rimpang menghasilkan kalus sedang tunas menghasilkan planlet.

Gula tidak hanya merupakan sumber karbon dalam kultur jaringan tetapi dapat mempengaruhi ekspresi genetik, karena mempengaruhi kerja enzima-enzima dalam tumbuhan. Gen yang responsif terhadap gula juga diatur oleh sinar, sehingga dalam pembentukan metabolit sekunder,

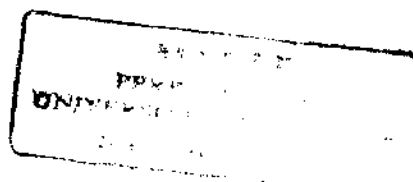
mungkin juga terjadi interaksi antara kadar gula dan intensitas sinar (Ehness, *et al.*, 1997).

Kultur jahe (*Zingiber officinale*) secara *in vitro* sudah dilakukan dan sudah berhasil sampai pembentukan planlet yang menghasilkan rhizoma. Analisis komponen minyak atsiri dari kultur *in vitro* tergantung pada sistem kulturnya terutama pada medium dan zat pengatur tumbuh yang dipakai (Robins and Rhodes, 1988). Panggabean (1993) mendapatkan fakta bahwa pH tanah mempengaruhi kadar minyak atsiri jahe dalam rimpang. Kadar tertinggi minyak atsiri dalam rimpang jahe didapat pada rimpang yang dipanen pada umur 7 bulan dan tumbuh pada tanah yang mempunyai pH 6, sedang pada rimpang yang dipanen pada umur 9 bulan, minyak atsirinya tertinggi pada tanah yang mempunyai pH 5. Pada pH 7 kadar minyak atsiri lebih rendah dibanding dengan pada tanah pH 5 dan 6 pada umur pemanenan yang sama.

Firman *et al.*, (1989) dan Zwaving and Bos, (1990) telah berhasil mengidentifikasi komponen minyak atsiri *Curcuma heyneana*. Firman *et al.*, (1988) mendapatkan senyawa seskuiterpen guaian baru yang dinamakan oksikurkumenol di samping senyawa lain yang sudah diketahui, di antaranya: germakron, dehidrokurdion, isokurkumenol, kurkumenol, kurkumanolid A dan B, serta zerumbon yang diisolasi dari rhizoma *Curcuma heyneana* dengan cara destilasi uap.

Sel pembentuk metabolit sekunder yang letaknya tertentu dapat dibuktikan oleh Malviya and Laloraya (1966) yang meneliti tentang biosin-

tesis antosianin dalam kecambah *Celosia*. Demikian juga dibuktikan oleh Elliot (1983) yang meneliti pengaruh sitokinin terhadap pembentukan betasianin pada kecambah *Amaranthus tricolor*. Penelitian Elliot mendapatkan hasil bahwa sitokinin atau sinar merah dapat direspons oleh sel epidermis bawah kotiledon (kecuali sel penutup stoma) dan endodermis hipokotil untuk memacu akumulasi betasianin.



BAB III

KERANGKA KONSEPTUAL PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual

Tunas rimpang temu giring (*Curcuma heyneana* Val and van Zijp) merupakan organ yang mengandung jaringan meristematik. Hasil pembelahan sel jaringan meristematik adalah sel yang tetap meristematik dan sel yang mengalami diferensiasi (Fahn, 1990); Esau, 1997). Tunas temu giring mengandung meristem ujung batang dan ujung akar yang terbungkus oleh pelepah calon daun. Jika tunas dipotong ada bagian yang meristematik yang dapat tumbuh lama yaitu bagian meristematik ujung sedang bagian calon daun mempunyai pertumbuhan yang terbatas. Dengan demikian potensi pertumbuhan bagian-bagian tunas berbeda.

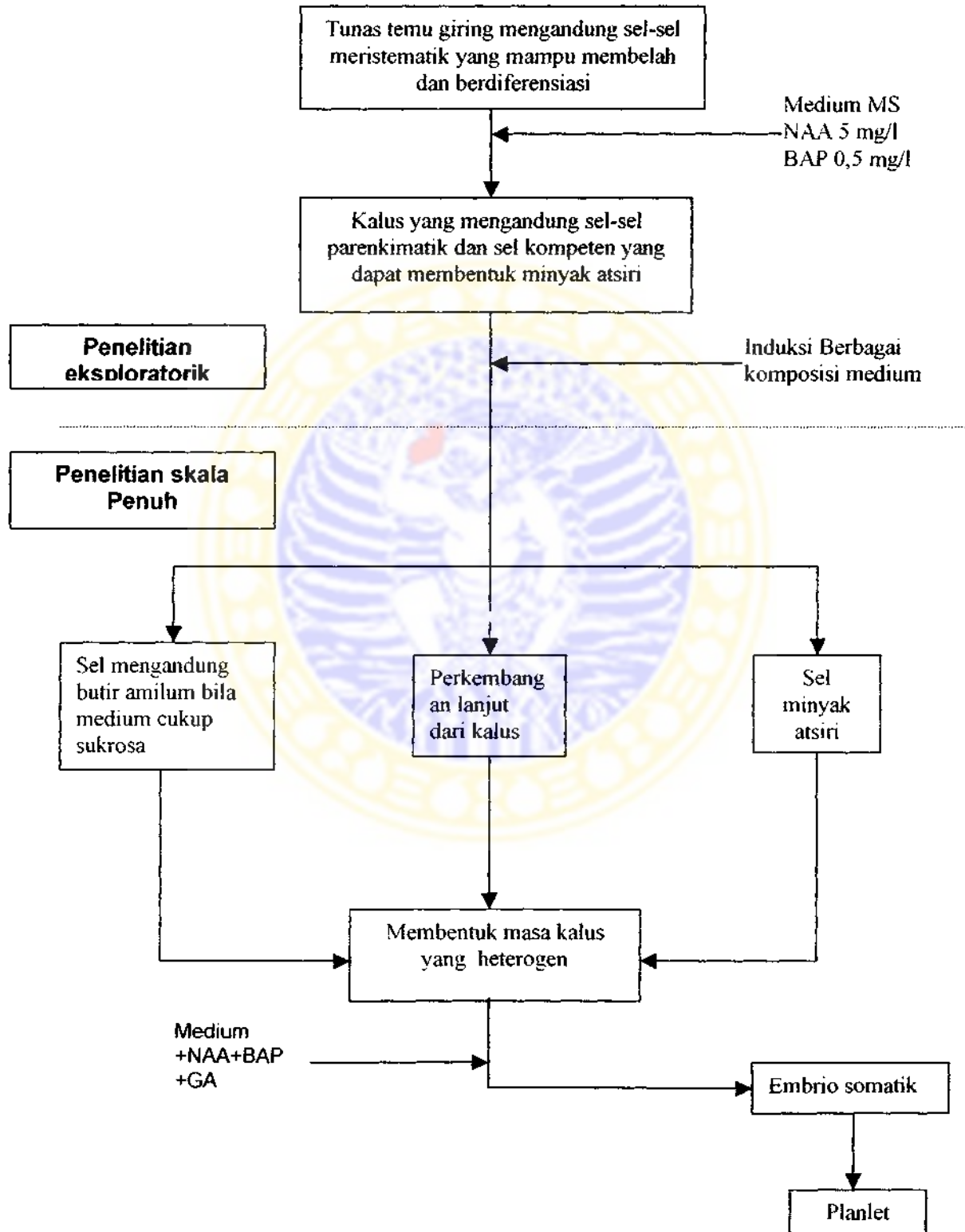
Status eksplan sangat menentukan pertumbuhan kalus secara *in vitro*. Eksplan yang muda lebih cepat tumbuh dibandingkan dengan eksplan yang sudah tua (Yeoman, 1986; Stoffer dan Warren, 1991). Selain itu komposisi medium dan zat pengatur tumbuh juga berperan dalam kultur *in vitro*.

Di samping kecepatan tumbuh yang berbeda juga ada perbedaan hasil pertumbuhan. Dari eksplan mungkin tumbuh: planlet, tunas, akar, kalus, atau planlet bersama-sama dengan kalus tergantung komposisi zat pengatur tumbuh dan medium yang digunakan untuk kultur. Biasanya sel atau jaringan yang dikultur akan menghasilkan turunan yang sama dengan induknya (Dodds & Robert, 1995)

Pada dasarnya kelompok auksin akan memacu pemanjangan organ sedang kelompok sitokinin akan memacu pembelahan sel. Untuk membentuk kalus diperlukan perbandingan auksin dan sitokinin yang seimbang (Dodds and Robert, 1995). Giberelin dapat meningkatkan kadar metabolit sekunder pada beberapa jenis tumbuhan (Evans, 1989). Untuk setiap tanaman kebutuhan nutrisi dan zat pengatur tumbuhnya berbeda.

Pada monokotil seperti temu giring untuk membentuk kalus diperlukan auksin saja (Pierik, 1987). Dalam penelitian ini dilakukan induksi kalus pada tunas rimpang temu giring. Kalus yang dihasilkan diamati perkembangannya. Selain itu sel-sel kalus diarahkan menjadi sel minyak atsiri dengan penambahan sukrosa sebagai prekursor minyak atsiri. Minyak atsiri biasanya mengandung terpena (Evans, 1989; Simpson and Ogorzaly, 1986). Minyak atsiri pada temu giring mengandung terpena (Firman *et al.*, 1988). Selanjutnya diamati juga pengaruh pemberian asam giberelat terhadap perkembangan kalus temu giring.

Skema kerangka konseptual penelitian ini sebagai berikut:



BAB IV

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dibagi menjadi dua tahap, yaitu: (1) penelitian pendahuluan yang berupa kajian eksploratorik, dan (2) penelitian dengan skala penuh.

4.1 Kajian Eksploratorik

Dalam tahap ini dilakukan pemilihan eksplan untuk induksi kalus, kombinasi zat pengatur tumbuh yang cocok untuk induksi kalus: Kalus yang dihasilkan diamati secara mikroskopik menggunakan mikroskop cahaya dan mikroskop fluoresen. Identifikasi sel komponen kalus dengan reagensia biru metilen, sudan III dalam alkohol, dan IKI.

4.1.1 Tempat penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan Tumbuhan Universitas Negeri Malang (UM) dan Universitas Brawijaya Malang (UNIBRAW). Waktu yang diperlukan untuk penelitian ini 18 bulan, mulai Januari 1998 sampai dengan Juli 1999.

4.1.2 Rancangan penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan deskriptif observasional.

4.1.3 Tujuan penelitian

Penelitian ini ditujukan untuk:

1. mendapatkan eksplan yang sesuai untuk induksi kalus
2. medium yang sesuai untuk induksi kalus
3. kombinasi zat pengatur tumbuh yang cocok untuk induksi kalus
4. identifikasi sel minyak atsiri temu giring

4.1.4 Alat dan bahan

Alat – alat yang diperlukan dalam penelitian ini adalah botol-botol untuk pertumbuhan kalus, alat seksi, autoklaf, oven, alat-alat gelas untuk membuat larutan, timbangan analitik Mettler AE 200, kompor (LPG), Laminar Air Flow SCB- 1000A Shimadzu, lampu spiritus, botol semprot, piring petri, pH meter TOA HM-12 P dan mikroskop binokuler Labophot 2 serta mikroskop fluoresen, alat pengaduk magnetik (*magnetic stirer*).

Bahan yang diperlukan di antaranya: planlet steril temu giring yang didapat dari kultur tunas rimpang temu giring dari BPOT Tawangmangu. Bahan kimia yang diperlukan adalah bahan kimia yang dipakai untuk membuat medium MS, NAA, sukrosa (Merck), BAP, akuades, alkohol 70%, HgCl₂ (Merkuri Klorida), larutan NaClO (Baycline), agar (Bacto), spiritus dan aluminium foil (Heavy Duty).

4.1.5 Pelaksanaan penelitian

4.1.5.1 Seleksi eksplan temu giring untuk induksi kalus

a. Penyiapan eksplan

Rimpang temu giring yang didapat dari BPOT Tawangmangu dicuci dengan deterjen cair sampai bersih kemudian dimasukkan ke dalam kantong plastik ditunggu sampai muncul tunasnya. Tunas yang sudah mencapai 2 cm dipakai sebagai eksplan. Kendala utama dalam penelitian ini adalah jamur yang mengganggu pertumbuhan tunas.

b. Pembuatan medium

Dalam penelitian ini digunakan medium dasar MS penuh (Murashige Skoog, 1962) dengan penambahan sukrosa 30 mg/l yang selanjutnya diberi nama MS₀ dan medium A yang terdiri dari MS₀ ditambah NAA 5 mg/l dan BAP 0,5 mg/l. Setelah semua bahan dicampur kemudian pH medium diukur dengan pH meter TOA HM-12 P. pH medium dibuat 5,80. Larutan medium dimasak dan ditambah agar 7,0 g/l setelah agar benar-benar larut dan homogen, medium dibagi ke dalam botol-botol kecil untuk penanaman, ditutup dengan aluminium foil (Heavy Duty). Setelah itu disterilkan dengan autoklaf pada suhu 115°C selama 15 menit. Medium yang sudah disimpan selama 3 hari dan tidak mengalami kontaminasi dapat digunakan untuk menanam.

c. Sterilisasi eksplan

Tunas temu giring (*Curcuma heyneana* Val & van Zijp) yang panjangnya kurang lebih 2 cm dicuci dengan deterjen cair, dibilas sampai bersih dengan air mengalir dan terakhir dibilas dengan akuades steril, kemudian pelepah paling luar dikupas dan ditambah satu tetes deterjen. Setelah itu disterilkan dengan HgCl₂ 0,15 % menggunakan "magnetic stirer" selama 20 menit. Pekerjaan ini dilakukan diluar "Laminar Air Flow"

(LAF). Sterilisasi dilanjutkan di dalam LAF. Setelah HgCl_2 dituang, sterilan diganti dengan larutan NaClO (Baycline) 10 % digojog-gojog selama 10 menit. Sterilan dituang diganti akuades steril digojog selama 5 menit kemudian akuades dituang. Pencucian dengan akuades steril dilakukan sebanyak 3 kali. Tunas yang sudah steril dikupas lagi selubung terluarnya dan dipotong menjadi 3 bagian yaitu ujung, tengah dan pangkal.

d. Penanaman eksplan

1. Potongan tunas ditanam ke dalam medium A, setiap botol diisi satu potong. Masing-masing bagian tunas ujung, tengah dan pangkal sebanyak 5 botol. Penanaman dilakukan dengan 3 kali ulangan. Setiap hari diamati respons eksplan terhadap medium dan hasil pengamatan dimasukkan dalam tabel.
2. Hasil pertumbuhan eksplan yang berupa planlet digunakan untuk stok eksplan steril dan yang berupa kalus ditanam dalam medium A untuk eksplan penelitian tahap berikutnya.

e. Pengamatan eksplan

Penampang melintang rimpang temu giring di amati sel penyusunnya dengan menggunakan reagen biru metilen dan sudan III dalam alkohol. Pengamatan ini ditujukan untuk membedakan sel-sel parenkima dan sel minyak atsiri. Alat yang digunakan adalah mikroskop cahaya Labophot II dan mikroskop flouresen dengan filter biru BV-2A.

Selain dilakukan pengamatan penampang melintang planlet hasil kultur *in vitro*. Kalus dibuat preparat diuraikan sel-selnya dengan jarum dan dibuat preparat kemudian diamati dengan mikroskop Labophot II dan mikroskop flourescen dengan filter biru BV-2A.

4.1.5.2 Seleksi media untuk pertumbuhan kalus

a Penyiapan eksplan

Eksplan yang digunakan dalam penelitian ini adalah planlet steril bagian pangkal dari kalus hasil pertumbuhan penelitian sebelumnya.

b Pembuatan media

Media yang digunakan untuk penelitian ini adalah medium A seperti tahap sebelumnya, medium B dengan komposisi medium A tetapi konsentrasi amonium nitrat (NH_4NO_3) setengah medium A dan medium C sama dengan medium B tetapi ditambah KCl.

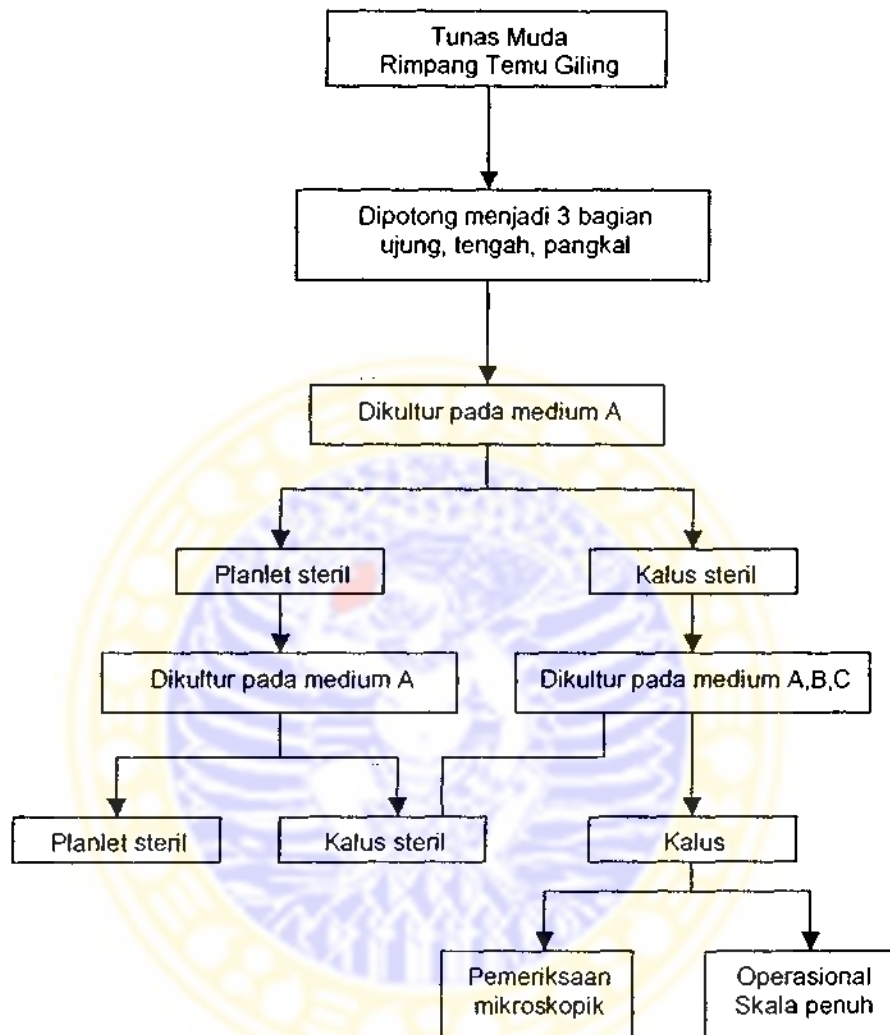
c Penanaman eksplan

Kalus yang berasal dari planlet steril ditanam di medium A, B, dan C.

d Pengamatan hasil pertumbuhan eksplan

Kalus yang tumbuh pada medium A, B, dan C diamati morfologinya dan ditimbang beratnya setiap minggu untuk dipilih medium yang paling banyak menghasilkan kalus. Selain itu juga diamati struktur mikroskopiknya dengan mikroskop Labophot II. Medium yang paling banyak menghasilkan kalus dan mengandung sel minyak atsiri dinyatakan sebagai medium terpilih untuk penelitian skala penuh

Adapun skema penelitian tahap eksploratorik adalah sebagai berikut:



4.2 Penelitian dengan Skala Penuh

4.2.1 Tempat penelitian

Penelitian ini dilakukan di laboratorium kultur jaringan Universitas Negeri Malang dan Universitas Brawijaya Malang. Untuk mengamati pengaruh kadar sukrosa dan penambahan Giberelin (GA_3) terhadap perkembangan sel minyak atsiri dalam kalus yang tumbuh pada medium terpilih. Waktu yang diperlukan untuk pengamatan adalah 18 bulan.

4.2.2 Rancangan penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah deskriptif observasional.

4.2.3 Tujuan penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mencari prekursor minyak atsiri dan mengkaji pengaruh asam giberelat terhadap perkembangan sel minyak atsiri pada kalus temu giring.

4.2.4 Alat dan Bahan

Alat – alat yang diperlukan dalam penelitian ini adalah botol-botol untuk pertumbuhan kalus, alat seksi, autoklaf, oven, alat-alat gelas untuk membuat larutan, timbangan analitik Mettler AE 200, kompor (LPG), Laminar Air Flow SCB- 1000A Shimadzu, lampu spiritus, botol semprot, piring petri, pH meter TOA HM-12 P dan mikroskop binokuler Labophot 2 serta mikroskop fluoresen, alat pengaduk magnetik (*magnetic stirer*), alat destilasi berkesinambungan modifikasi Likens-Nickerson, gas kromatografi

Bahan yang diperlukan diantaranya: planlet steril temu giring yang didapat dari kultur tunas rimpang temu giring dari BPOT Tawangmangu.

Bahan kimia yang diperlukan adalah bahan kimia yang digunakan untuk membuat medium MS, NAA, sukrosa (Merck), BAP, akuades, Giberelin (GA_3), alkohol 70%, $HgCl_2$ (Merkuri Klorida), larutan $NaClO$ (Baycline), agar (Bacto), spiritus dan aluminium foil (Heavy Duty).

4.2.4 Pelaksanaan penelitian

a. Peyiapan eksplan

Eksplan dalam penelitian ini adalah kalus hasil penelitian tahap I yang tumbuh pada medium terpilih dan berumur 1 bulan. Dipilih kalus yang berwarna putih transparan. Berat kalus antara 100 – 300 mg.

b. Pembuatan medium

Digunakan 5 macam medium yaitu medium A, D, E, F, dan G. Medium A, D, E adalah medium padat dengan medium MS penuh dan zat pengatur tumbuh NAA 5 mg/l dan BAP 0,5 mg/l, tetapi konsentrasi sukrosa berbeda yaitu 20 mg/l untuk medium D, 30 mg/l untuk medium A, dan 40 mg/l untuk medium E. Medium F adalah medium A ditambah GA 5 mg/l dan medium G sama dengan medium F tetapi tanpa agar (cair). Setelah semua bahan dicampur, larutan medium diukur pH-nya dengan pH meter (TOA), pH dibuat 5,80. Untuk medium yang bersifat cair (G) langsung dibagikan ke dalam botol-botol kemudian ditutup aluminium foil (Heavy duty) dan disterilkan dengan autoklaf. Untuk medium A, D, E, dan F dimasak dulu untuk melarutkan agar, setelah homogen dibagikan ke dalam botol-botol kecil ditutup aluminium foil (Heavy duty) dan disterilkan dengan autoklaf dengan suhu $115^{\circ}C$ selama 15 menit, setelah medium disimpan selama 3 hari dan tidak mengalami kontaminasi dapat digunakan untuk menanam.

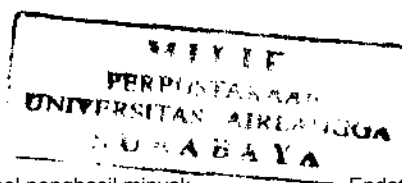
c. Penanaman eksplan

Kalus yang didapat dari penelitian tahap I dipindahkan ke dalam piring petri steril yang diberi alas kertas hisap basah, warna kalus akan lebih keruh. Kalus yang berwarna coklat disisihkan. Kalus yang putih dipotong kurang lebih 0,5 cm dimasukkan ke dalam tabung mikrosentrifus steril (Apendrof) kemudian ditimbang beratnya. Kalus yang sudah ditimbang dimasukkan ke dalam botol yang berisi medium A, D, E, F, G dan ditutup lagi selanjutnya kalus di inkubasi di ruang yang sesuai dengan lampu neon 40 watt/m². Untuk kalus yang ditanam di medium F dan G setelah ditimbang dimasukkan ke dalam medium cair dan digoyang-goyang dengan "shaker" berkecepatan 100 rpm.

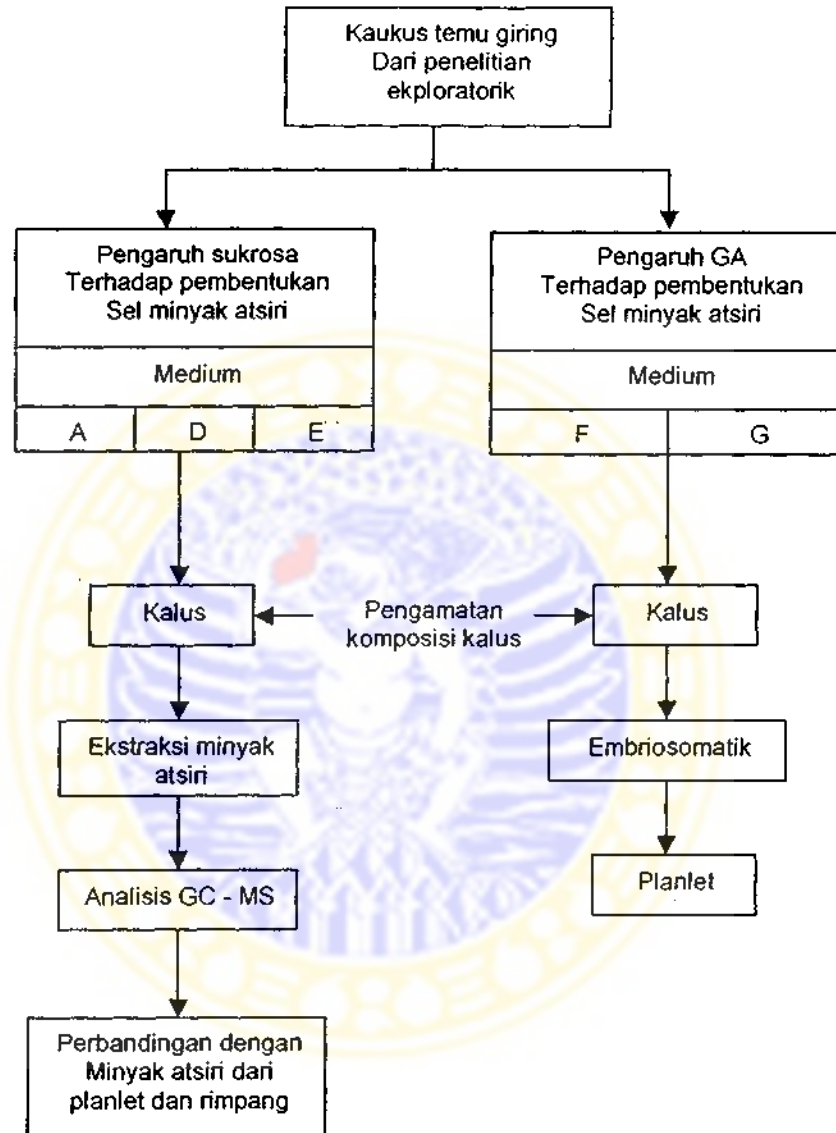
d. Pengamatan hasil penelitian

Kalus yang tumbuh dalam medium A, D, E, F, G diamati setiap hari pertumbuhannya. Setelah kalus yang tumbuh pada medium A, D, E berumur satu bulan ditimbang beratnya dan hasil penimbangan berat basah kalus dibuat tabel. Setelah itu komponen kalus diamati dengan mikroskop cahaya (labophot II) dan mikroskop fluoresen menggunakan filter BV-2A dan reagen sudan III 0,1% dalam alkohol dan larutan biru metilen. Pengamatan dilakukan terhadap bentuk dan isi sel penyusun kalus. Kalus yang berumur satu bulan dan tumbuh di medium A diekstraksi dengan alat ekstraksi berkesinambungan modifikasi Nickerson dengan penyari petroleum eter. Hasil ekstraksi dianalisis dengan GC-MS. Ekstraksi dan analisis GC-MS juga dilakukan terhadap rimpang dan planlet.

Untuk kalus yang ditumbuh di medium F dan G diamati juga secara mikroskopik dan makroskopik seperti pada kalus yang tumbuh pada medium A, D dan E. Hasil pengamatan direkam dalam bentuk foto dan tabel.



Adapun skema penelitian tahap skala penuh ini adalah sebagai berikut:



BAB V

HASIL PENELITIAN

5.1 Hasil Penelitian Eksploratorik

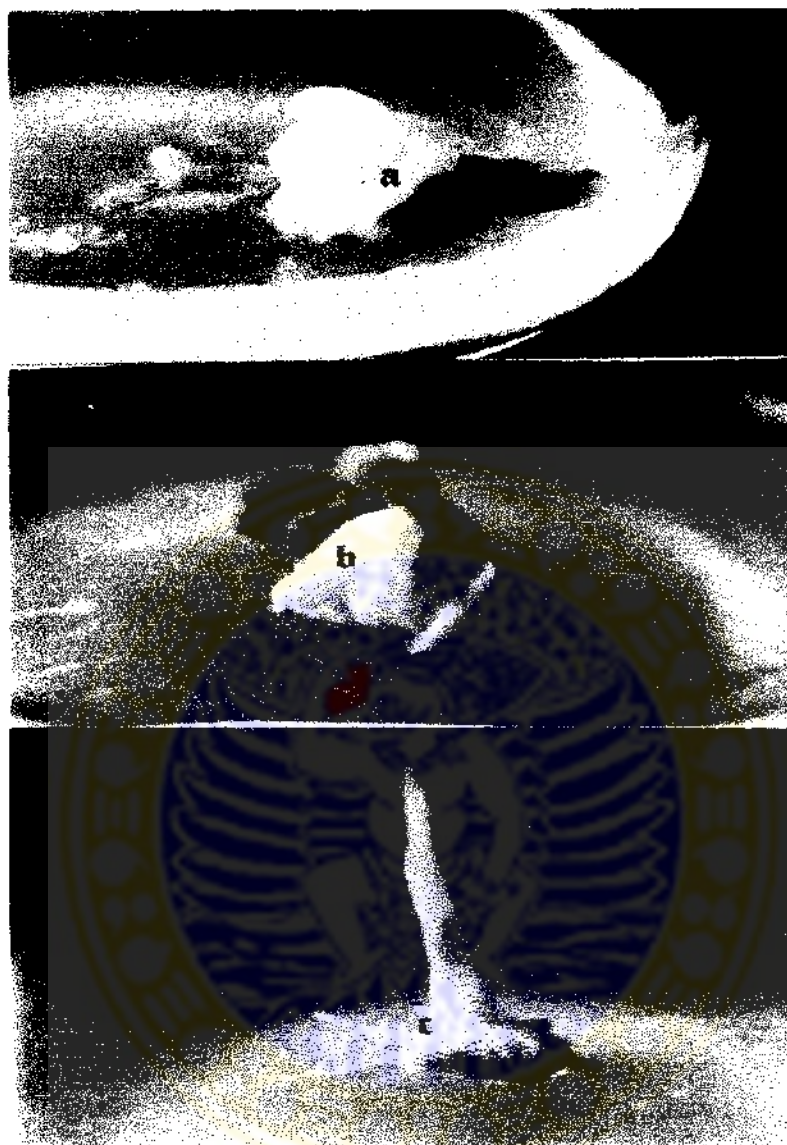
5.1.1 Seleksi eksplan untuk induksi kalus temu giring

Untuk seleksi eksplan digunakan tunas rimpang temu giring yang dipotong menjadi tiga bagian, yaitu: ujung, tengah, dan pangkal. Potongan eksplan dikultur pada medium MS dengan zat pengatur tumbuh NAA 5 mg/l dan BAP 0,5 mg/l (komposisi medium lihat medium A pada lampiran 1. Respons eksplan temu giring pada medium A dapat dilihat pada tabel 5.1. dan gambar 5.1.

Tabel 5.1. Respons eksplan temu giring pada medium A dilihat secara makroskopik

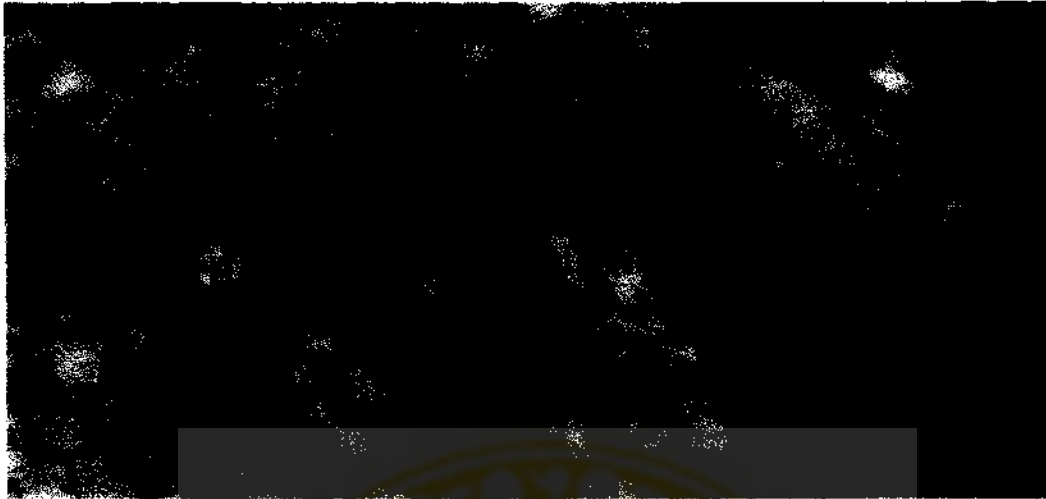
| Jenis eksplan | Respons minggu ke | | | | | |
|---------------|-------------------|-------------|----------------------|-----------------------------|---|-------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| Tunas ujung | Menggembung | Menggembung | Menggembung | Membuka | Berhenti | Berhenti |
| Tunas tengah | Menggembung | Menggembung | Menggembung | Membuka | Membuka | Berhenti |
| Tunas pangkal | Tumbuh | Tunas | Tunas + akar + kalus | Tunas+ akar berbulu + kalus | Tunas membuka + akar bertambah + kalus membesar | Planlet dan kalus |

Untuk memperkuat data di atas dilakukan pemotretan dan hasilnya tampak seperti pada gambar 5.1.

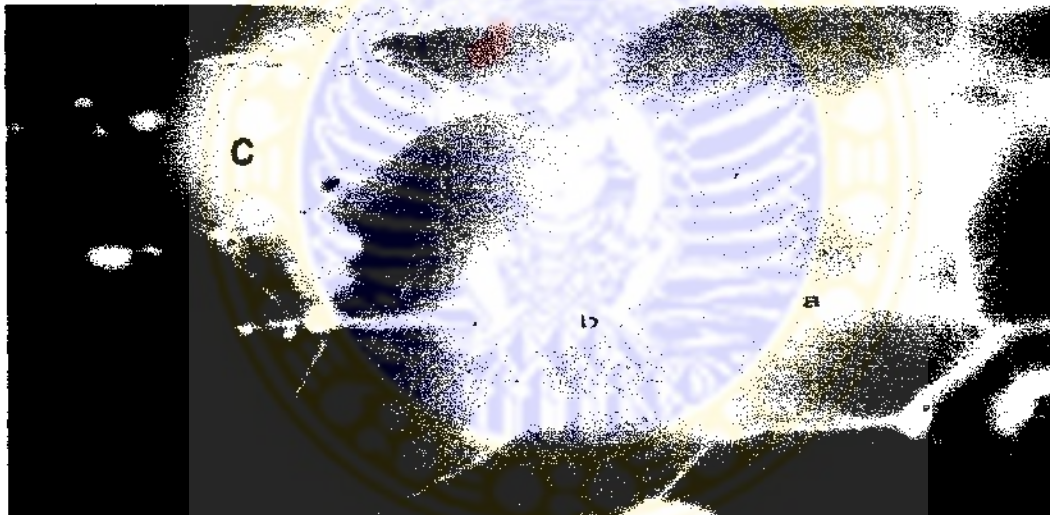


Gambar 5.1. Pertumbuhan tunas temu giring pada medium A. (a) tunas ujung, menggembung, (b) tunas tengah, menggembung, (c) tunas pangkal, membentuk planlet dan kalus.

Untuk mendeteksi sel minyak atsiri atau minyak atsiri dalam eksplan dilakukan pembuatan preparat penampang melintang dari rimpang temu giring yang direaksikan dengan larutan Sudan III dalam alkohol, kemudian preparat diamati dengan mikroskop Labophot 2 dan mikroskop fluoresen. Hasil pengamatan direkam dalam gambar 5.2. dan 5. 3.

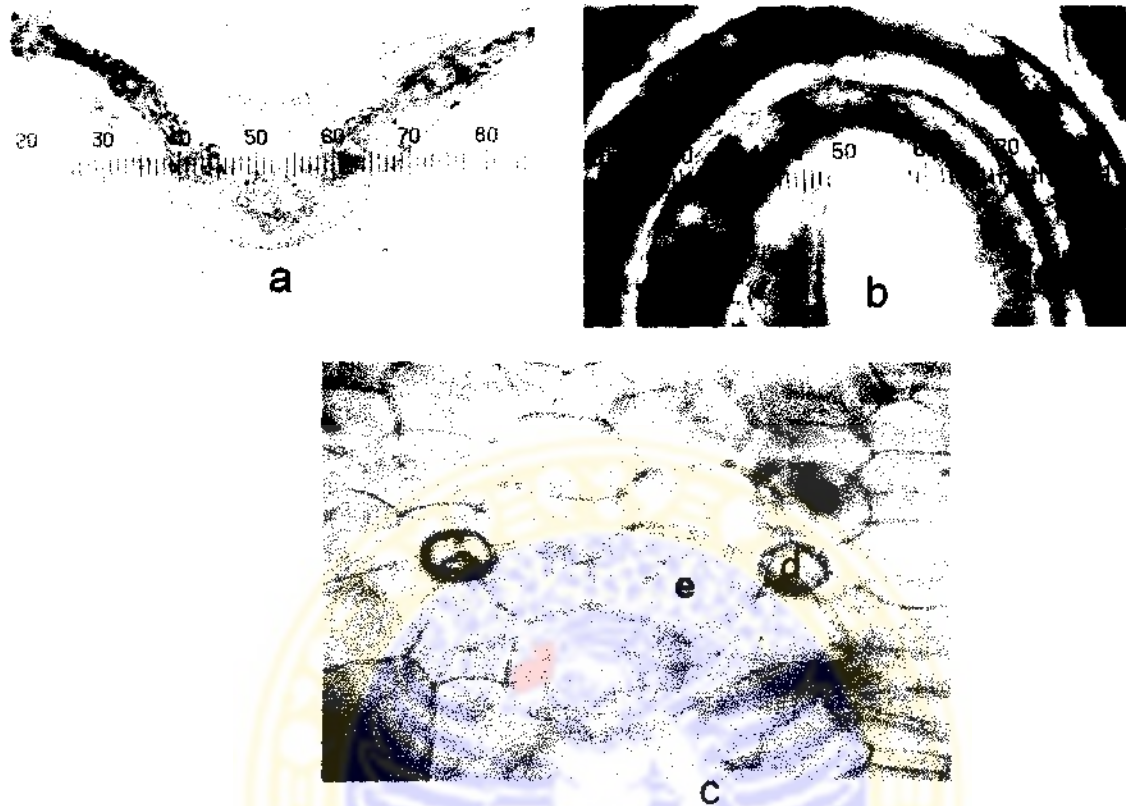


Gambar 5. 2. Penampang melintang rimpang temu giring dengan larutan Sudan III dilihat dengan mikroskop Labophot 2, a) sel minyak atsiri berwarna merah, b) sel parenkima, tanda garis menunjukkan 68 mikrometer.



Gambar 5. 3. Penampang melintang rimpang temu giring dilihat dengan mikroskop fluoresens menggunakan filter biru BV-2A, a) dinding sel berwarna biru b) minyak atsiri, c) sel minyak atsiri berwarna kekuningan. Garis merah menunjukkan ukuran 12,5 μ

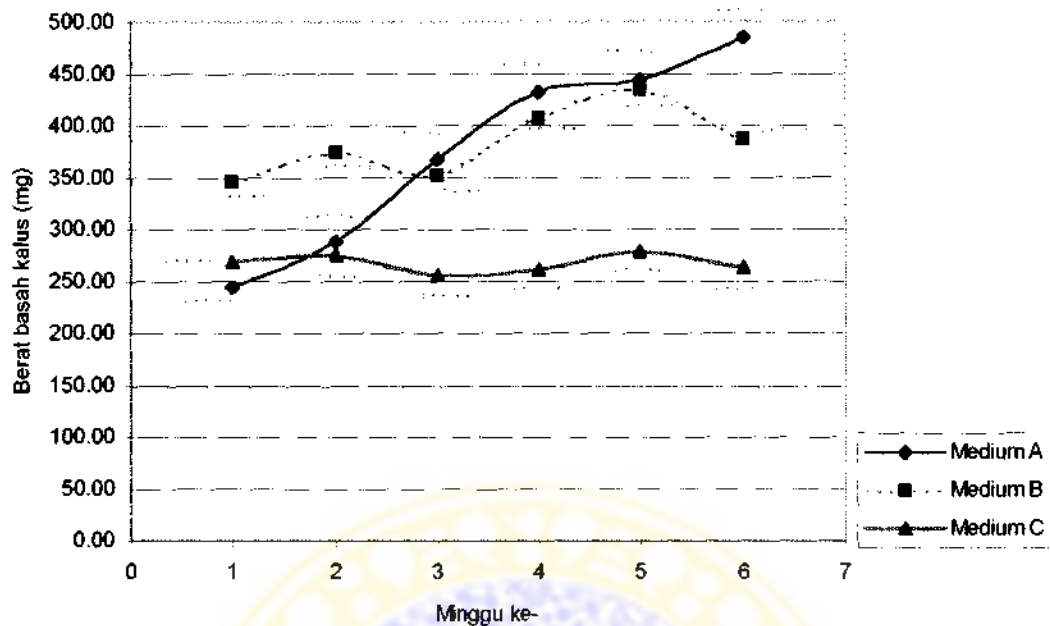
Planlet temu giring dibuat penampang melintang bagian ujung, tengah dan pangkal. Bagian ujung menampakkan struktur daun, bagian tengah stuktur pelepah dan bagian pangkal menunjukkan struktur rimpang. Sel minyak atsiri berwarna kuning muda. Hasil pengamatan penampang melintang planlet temu giring nampak pada gambar 5.4.



Gambar 5. 4. Penampang melintang planlet temu giring: a) bagian ujung menampakkan struktur daun, b) bagian tengah struktur pelepah, c) struktur rimpang, d) sel minyak atsiri, e) sel parenkima.

5.1.2 Seleksi medium untuk pertumbuhan kalus temu giring

Untuk seleksi medium pertumbuhan kalus digunakan tiga macam medium yaitu medium A, B, dan C. Hasil pertumbuhan kalus ditimbang setiap minggu dan hasilnya direkam dalam grafik seperti pada gambar 5.5. Kendala dalam penelitian ini adalah kontaminasi jamur atau bakteri.



Gambar 5.5. Grafik garis berat basah kalus pada medium A, B, C selama 6 minggu

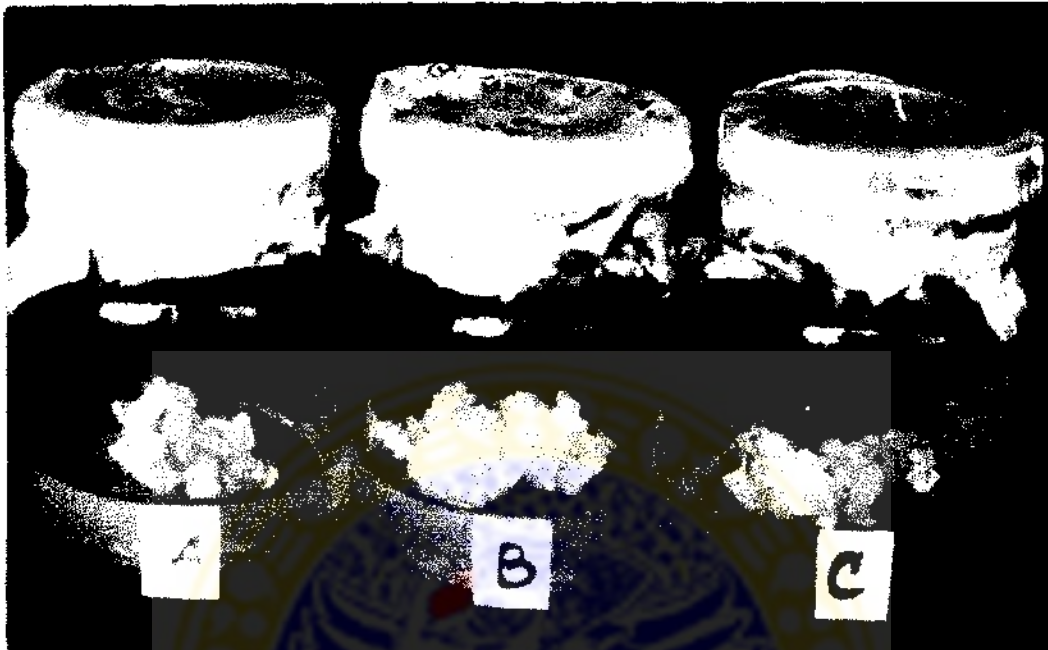
Pengamatan miroskopik terhadap kalus untuk melihat kandungan sel kalus yang tumbuh pada medium A, B, C dapat dilihat pada tabel berikut.

Tabel 5.2. Hubungan antara umur kalus dan kandungan sel minyak atsiri pada medium A, B, C

| Jenis Medium | Umur kalus dalam bulan | Kondisi kalus | Jumlah Sel minyak atsiri |
|--------------|------------------------|-------------------------|--------------------------|
| A | 0,5 | Putih | 1 |
| | 1 | Putih | 5 |
| | 3 | Putih | 3 |
| | 4 | Kuning | 3 |
| | 8 | Putih lembek | 10 |
| B | 2 | Coklat tua, remah | 1 |
| | 3 | Putih transparan | 2 |
| | 4 | Putih remah | 1 |
| | 5 | Putih | 2 |
| C | 2 | Putih remah | 1 |
| | 3 | Kuning keras | 3 |
| | 4 | Putih transparan, remah | 1 |
| | 6 | Coklat | 1 |
| | 10 | Putih transparan | 5 |

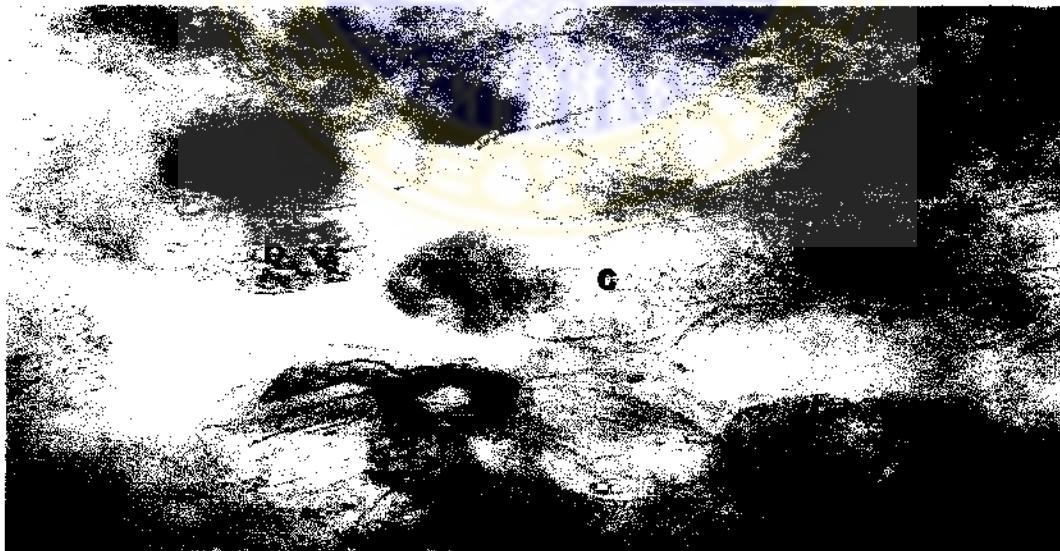
Catatan: Pertumbuhan kalus lambat

Pengamatan makroskopik pertumbuhan kalus pada medium A, B, dan C dapat dilihat pada gambar 5.6.



Gambar 5.6. : Pertumbuhan kalus temu giring pada medium A, B, dan C tidak menunjukkan perbedaan morfologi

Komposisi kalus yang tumbuh pada medium A dapat dilihat pada gambar 5.6.



Gambar 5.7. : a) Sel minyak, b) sel amilum, c) sel parenkima. Garis merah menunjukkan ukuran 12,5 μ .

5.2 Penelitian Dengan Skala Penuh

5.2.1 Pengaruh sukrosa terhadap pertumbuhan dan perkembangan kalus temu giring

Dalam penelitian ini digunakan medium A, D, E, yang berbeda kadar sukrosanya. Eksplan yang digunakan adalah kalus yang tumbuh pada medium A berumur satu bulan dan umumnya mengandung butir amilum. Pertumbuhan kalus dinyatakan dalam berat basah kalus yang ditimbang setelah kalus berumur 1 bulan. Hasil penimbangan dapat dilihat pada tabel 5.3.

Tabel 5.3. Pertambahan berat basah kalus yang berumur satu bulan dalam mg

| Ujangan | Medium | | |
|----------|---------|---------|---------|
| | D | A | E |
| 1 | 153,3 | 13,6 | 82,5 |
| 2 | 62,4 | 93,2 | 6,0 |
| 3 | 62,6 | 111,2 | 27,5 |
| 4 | 51,7 | 178,0 | 65,3 |
| 5 | 86,3 | 115,2 | 95,7 |
| 6 | 277,0 | 1068,4 | 752,6 |
| 7 | 260,3 | 31,9 | 150,4 |
| 8 | 26,4 | 1288,8 | 857,1 |
| 9 | 405,9 | 728,7 | 774,2 |
| 10 | 587,2 | 912,3 | 507,9 |
| 11 | 1390,3 | 354,9 | 397,3 |
| 12 | 629,3 | 193,0 | 439,8 |
| 13 | 880,6 | 255,7 | 379,8 |
| 14 | 354,4 | 229,0 | 277,7 |
| 15 | -64,5 | -48,7 | 2762,8 |
| Σ | 5168,2 | 5526,2 | 7575,8 |
| R | 344,213 | 368,413 | 505,060 |

Pengaruh kadar sukrosa terhadap pertumbuhan kalus temu giring dapat terlihat pada gambar 5.8.



Gambar 5.8. Pengaruh kadar sukrosa terhadap pertumbuhan kalus temu giring pada medium A, D, E

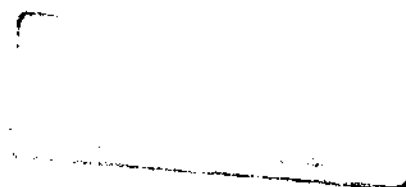
Pengamatan mikroskopik tentang pengaruh sukrosa dalam pembentukan amilum dan minyak atsiri dapat dilihat pada tabel 5.4.

Tabel 5.4. Pengaruh kadar sukrosa dalam pembentukan minyak atsiri dan amilum

| Jenis Medium | Umur Kalus (minggu) | | | | | | | | | | | | |
|--------------------|----------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | | 2 | | 3 | | 4 | | 5 | | 6 | | |
| | M | A | M | A | M | A | M | A | M | A | M | A | |
| D (Sukrosa 20 g/l) | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| A (Sukrosa 30 g/l) | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| E (Sukrosa 40 g/l) | - | - | | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |

Keterangan: M = minyak atsiri
+ = ada
A = Amilum
- = tidak ada

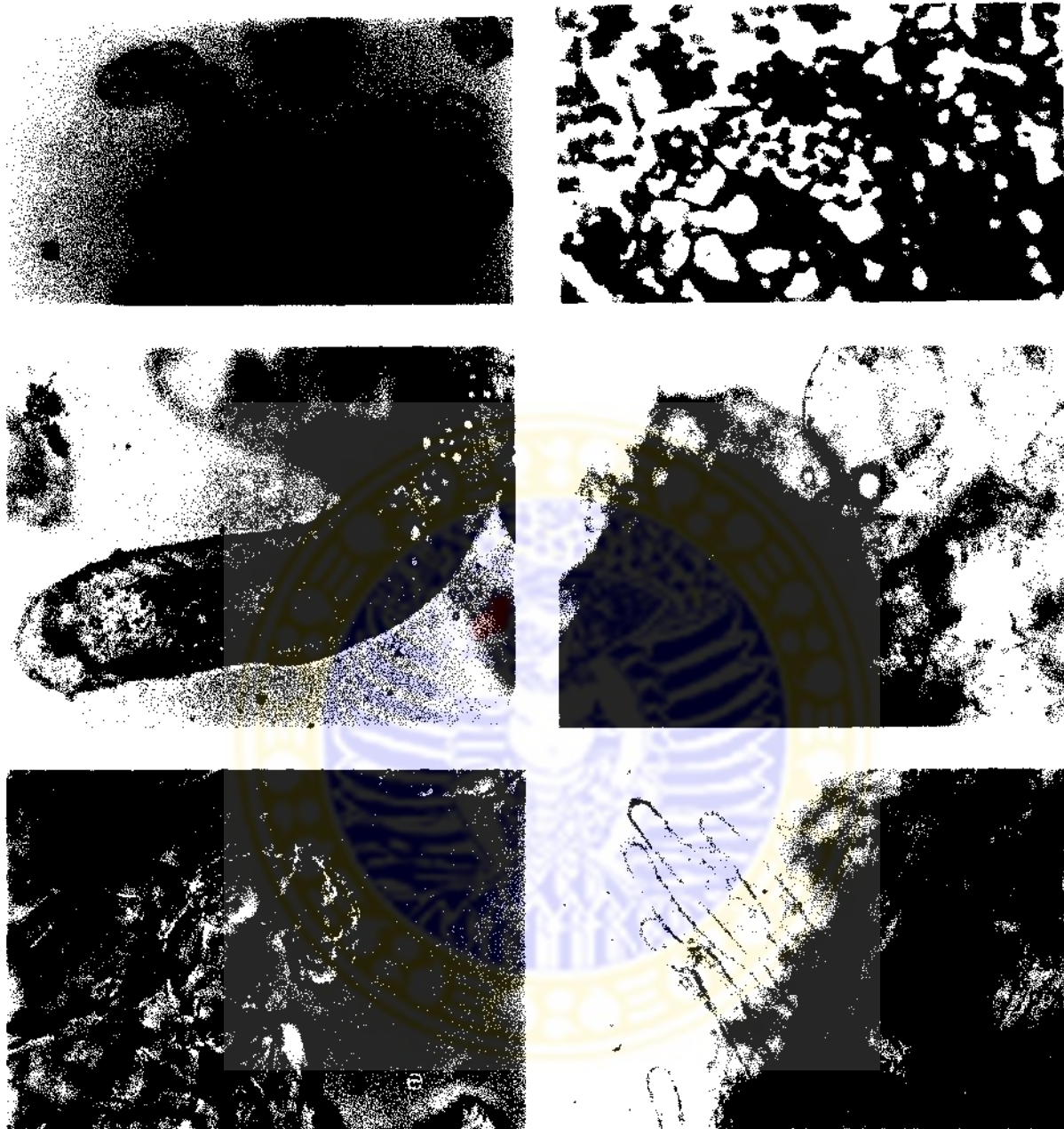
Diferensiasi kalus yang berumur 1 bulan yang tumbuh pada medium A, D, E nampak pada tabel 5.5.



Tabel 5.5. Komposisi Kalus yang Berumur 1 Bulan pada Medium D, A, dan E Per Bidang Pandang.

| Ulangan | Jenis medium | | | | | | | | | | | | | | |
|---------|--------------|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|------|------|-------|------|-------|------|------|
| | D | | | | | A | | | | | E | | | | |
| | P | A | MA | T | S | P | A | MA | T | S | P | A | MA | T | S |
| 1 | - | - | - | 8 | - | - | 5 | - | - | - | 9 | - | 3 | - | - |
| 2 | 12 | - | - | 4 | - | 18 | 2 | - | - | 1 | 7 | - | 4 | - | 1 |
| 3 | - | - | - | 6 | - | 14 | 1 | - | - | - | 8 | - | - | - | - |
| 4 | 6 | - | - | 2 | - | - | 13 | 3 | 7 | - | 15 | - | 3 | - | - |
| 5 | 12 | - | - | - | - | 8 | 2 | 1 | - | - | 6 | 2 | 2 | - | 1 |
| 6 | - | - | - | 1 | - | 3 | 1 | 2 | 2 | - | 10 | - | - | - | 1 |
| 7 | 12 | - | - | 4 | - | 15 | 1 | 2 | - | - | 6 | - | 1 | 1 | - |
| 8 | 3 | - | 2 | 12 | - | 8 | - | 3 | 1 | 1 | 10 | 4 | - | - | - |
| 9 | 30 | - | - | 2 | - | 8 | - | 3 | 1 | - | 6 | - | 1 | 4 | - |
| 10 | 10 | - | 3 | 2 | - | 6 | 1 | 3 | - | - | 10 | - | 1 | - | - |
| 11 | 11 | 3 | 1 | 2 | - | 5 | 1 | - | - | - | 8 | 1 | 2 | - | - |
| 12 | 8 | - | - | - | - | 7 | - | - | - | - | 8 | - | 4 | - | 1 |
| 13 | 4 | 3 | 1 | - | - | 3 | - | - | 1 | 1 | 10 | - | 3 | 1 | - |
| 14 | 6 | 1 | - | 4 | - | 8 | - | 1 | 1 | - | 10 | 1 | 2 | - | - |
| 15 | 10 | - | 4 | - | - | 10 | - | 1 | - | - | 2 | 3 | - | 3 | - |
| 16 | 7 | - | - | - | - | 6 | - | 1 | 1 | - | 6 | - | - | 2 | - |
| 17 | 10 | - | - | - | - | 11 | - | 3 | - | - | 2 | 2 | 2 | - | - |
| 18 | 8 | - | - | - | 1 | 15 | 2 | 4 | - | - | 2 | 3 | - | 2 | 1 |
| 19 | 7 | - | 1 | - | - | 4 | 3 | - | 3 | - | 2 | 3 | 1 | 1 | - |
| 20 | 15 | - | - | - | - | 10 | 2 | 2 | - | - | 5 | - | 2 | - | - |
| Σ | 171 | 7 | 12 | 47 | 1 | 159 | 34 | 29 | 17 | 3 | 158 | 19 | 31 | 14 | 5 |
| % | 71,85 | 2,94 | 5,04 | 19,75 | 0,004 | 65,70 | 14,05 | 11,98 | 7,02 | 1,24 | 69,60 | 8,37 | 13,66 | 6,17 | 2,20 |

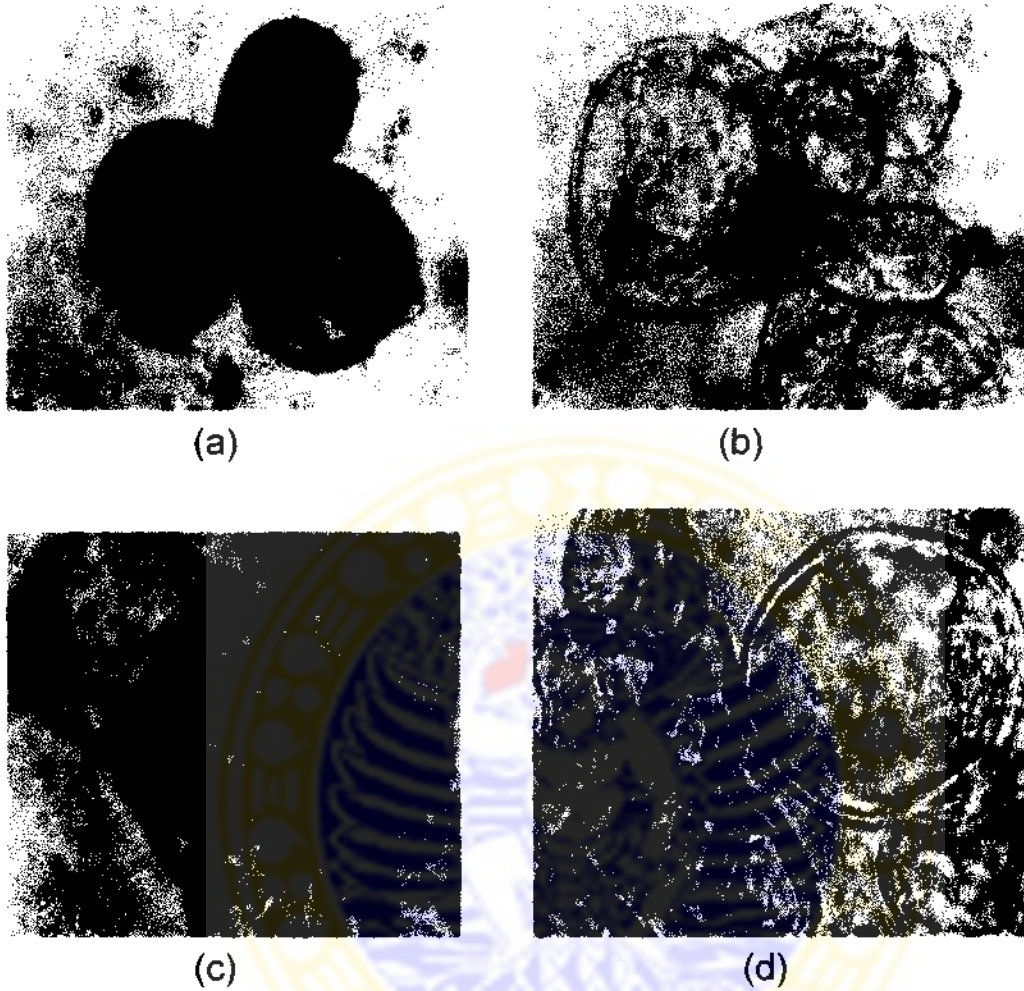
Keterangan: A = Butir Amilum, MA = Minyak atsiri, T = trakea, S = serabut, P = Parenkim



Gambar 5.9. Komposisi kalus temu giring a) sel parenkimatik, b) sel yang mengandung butir amilum eksentris, c) sel yang mengandung butir amilum dan minyak atsiri, d) sel yang mengandung minyak atsiri e) sel calon trakea, f) sel serabut.



Gambar 5.10. a) sel minyak atsiri dan amilum dilihat dengan mikroskop fluoresen filter BV-2A, b) sel minyak atsiri dilihat dengan mikroskop fluoresen filter G-2A



Gambar 5.11. Perkembangan sel minyak atsiri dalam kalus temu giring, a) sel muda tampak mempunyai inti dan sitoplasma penuh, b) sel mengandung butir amilum dan minyak atsiri mempunyai dinding sel tampak rangkap dan vakuola terbentuk di tepi, c) minyak atsiri makin banyak dan dinding sel tambah tebal, d) sel mengalami penuaan.

5.2.2 Pengaruh asam giberelat terhadap perkembangan kalus temu giring

Dalam penelitian digunakan penambahan asam giberelat pada medium A untuk mempercepat pembentukan minyak atsiri. Kultur dilakukan dalam medium padat dan medium cair.

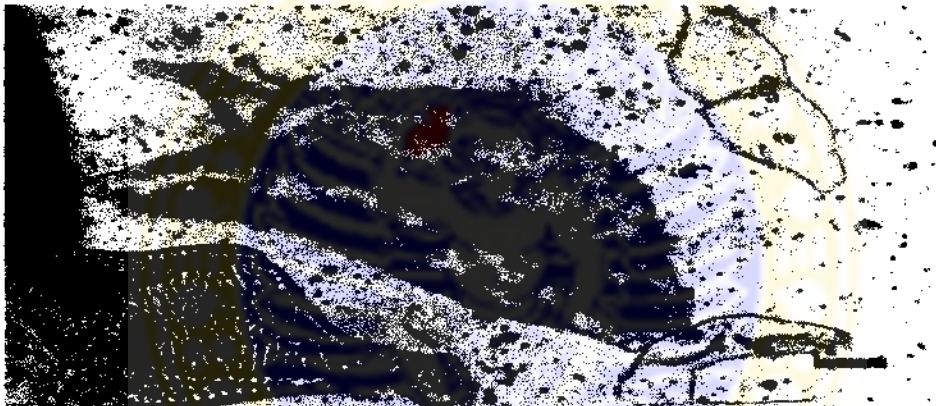
Pertumbuhan kalus dalam medium cair cepat dan menghasilkan kalus yang keras, warna agak hijau kemudian menjadi embrio somatik dalam waktu enam minggu. Pada medium padat demikian juga terjadi kalus yang keras dan embrio somatik baru tumbuh setelah enam minggu. Pertumbuhan kalus pada medium cair lebih cepat terutama dalam pembentukan tunas. Pertumbuhan kalus pada medium GA padat dan GA cair nampak seperti pada Gambar 5.12. di bawah ini.



Gambar 5.12. Pertumbuhan kalus temu giring pada medium GA padat (a) dan GA cair (b) selama 8 minggu

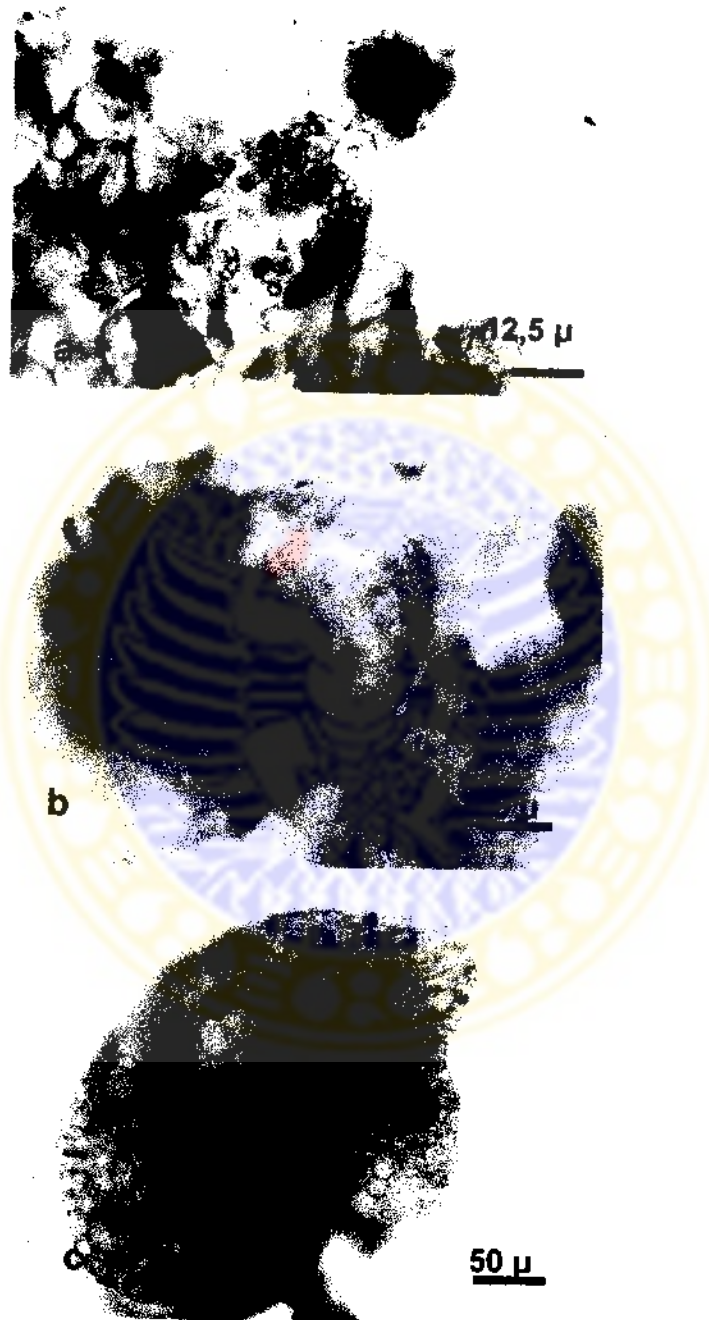
Tunas yang tumbuh pada medium GA cair (medium G) panjang tetapi berwarna putih sedang pada medium GA padat (medium F) nampak berwarna hijau.

Secara mikroskopik sel-sel kalus banyak yang mengalami diferensiasi menjadi trakea. Penebalan dinding sel pada sel-sel calon trakea tidak merata dan tidak serentak. Tahap-tahap pembentukan trakea dapat dilihat pada Gambar 5.13. Selain itu diferensiasi kalus menjadi trakea tidak hanya terjadi pada medium GA padat saja tetapi juga pada medium cair.



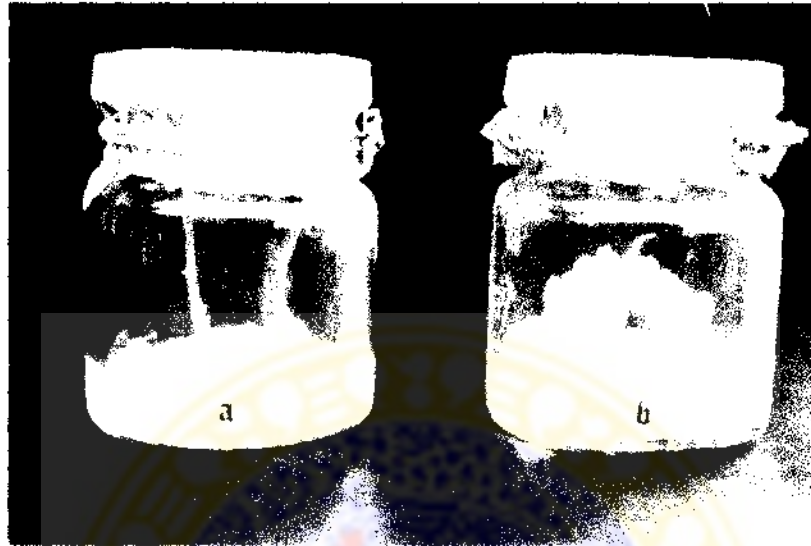
Gambar 5.13. Perkembangan sel kalus pada medium G menjadi trakea. a) calon trakea yang masih berinti, b) sel calon trakea yang berkembang dan mengandung butir amilum, c) trakea dengan penebalan bentuk jala dan lubang perforasi berekor. Garis merah menunjukkan 12,5 μ

Pada perkembangan embrio somatik dalam kalus yang tumbuh pada medium G tampak adanya sel-sel berbentuk isodiametrik mengandung butir amilum kemudian embrio somatik stadium globuler dan stadium jantung. Pada stadium jantung tampak ada sel calon minyak atsiri yang dikelilingi oleh sel-sel parenkimatik. Sel calon minyak atsiri lebih kecil dari sel di sekelilingnya seperti pada gambar 5.14.



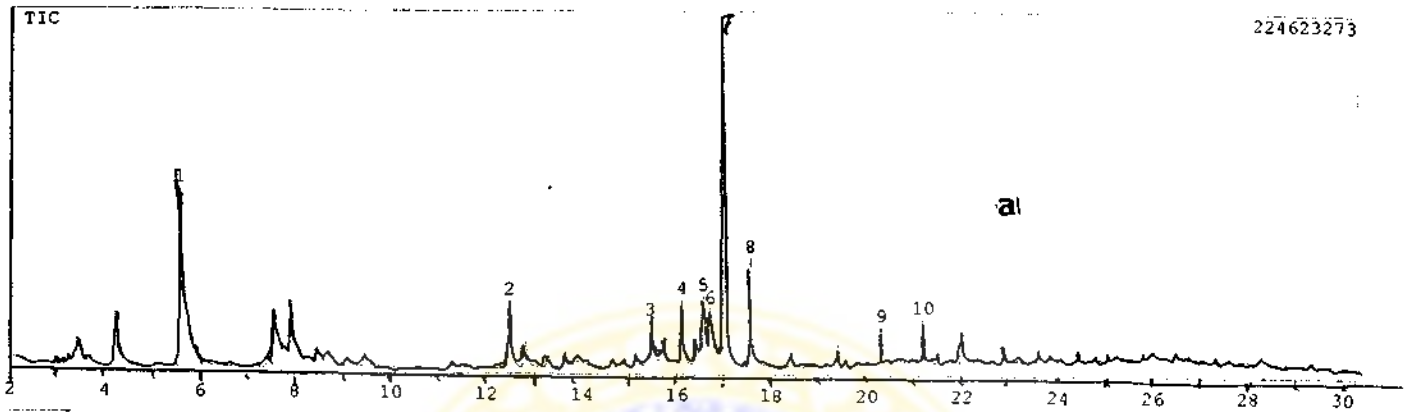
Gambar 5.14. a) sel parenkima yang mengandung butir amilum, b) embrio somatik tahap globuler, c) embrio somatik tahap jantung, d) calon sel minyak atsiri.

Perkembangan pada medium F dapat dilihat pada gambar 5.14. , mula-mula kalus mengeras berwarna hijau kemudian muncul tunas yang tumbuh memanjang menjadi planlet.

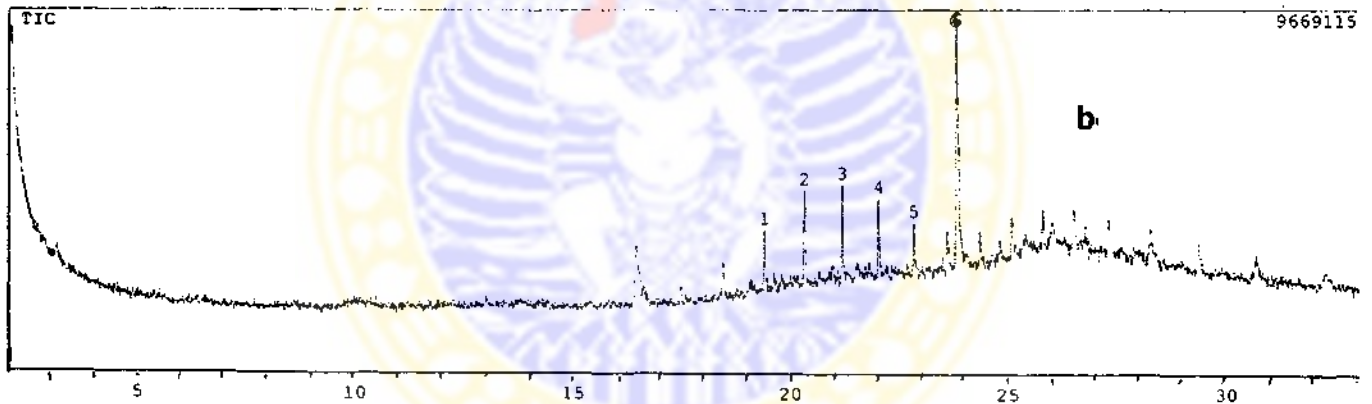


Gambar 5.15. Tunas yang tumbuh pada medium F, (a) planlet, (b) kalus yang mengeras dan berubah menjadi hijau dan coklat.

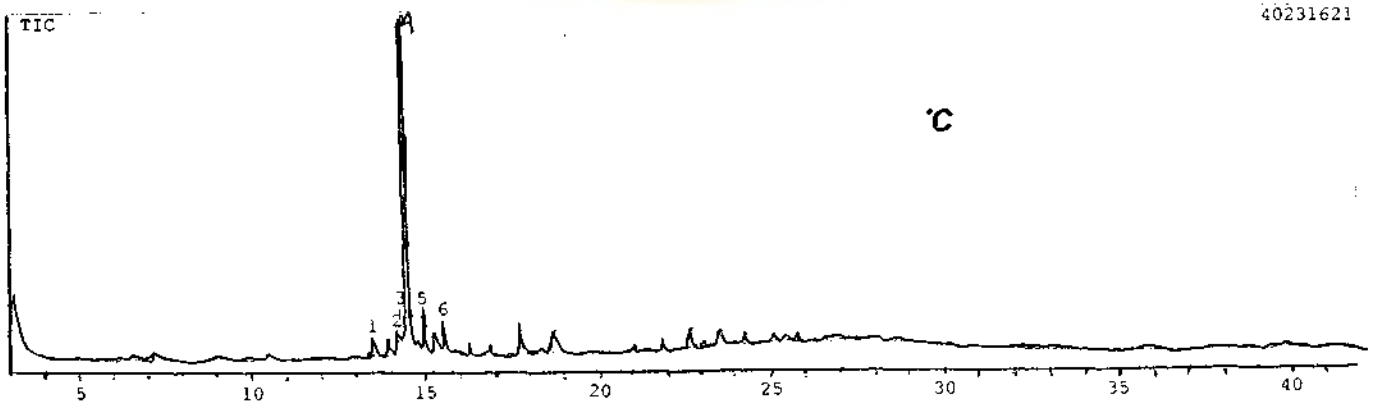
Data : ENDANG1.D01 02/07/25 17:44:30
 Sample : RIMPANG TEMU GIRING, ENDANG
 Operator : POY
 Method File Name : ENDANG.MET



Data : ENDANG.D01 02/07/25 17:01:53
 Sample : KALUS TEMU GIRING, ENDANG
 Operator : POY
 Method File Name : ENDANG.MET



Data : ENDANG.D02 02/11/01 09:51:19
 Sample : TEMU GIRING ~~planlet~~ ENDANG
 Operator : POY
 Method File Name : ENDANG1.MET



Gambar 5.16. Kromatogram GC-MS : a) rimpang temu giring b) kalus temu giring c) planlet

5.3. Analisis Data

Data penelitian pada tabel 5.2 tentang berat basah kalus yang tumbuh pada media A, B, C dan berumur 6 minggu dianalisis dengan Anava satu arah seperti pada tabel 5.7 di bawah ini.

Tabel 5.6. Ringkasan Anava satu arah berat basah kalus yang berumur 6 minggu pada media A, B dan C

| Sumber Keragaman | d.b | Jumlah Kuadrat | Kuadrat Tengah | F hitung | F tabel |
|------------------|-----|----------------|----------------|----------|---------|
| Perlakuan | 2 | 99365,0417 | 49682,5208 | 2,1493 | 4,26 |
| Galat | 9 | 208045,4675 | 23116,1631 | | |
| Total | 11 | 307410,5092 | | | |

Hasil analisis data menunjukkan nilai F hitung lebih kecil dari nilai F tabel, berarti perbedaan berat basah kalus yang tumbuh pada media A, B, C tidak signifikan.

Data hubungan antara umur kalus dengan jumlah sel yang mengandung minyak atsiri pada tabel 5.3 dianalisis dengan metode chi square. Hasil analisis chi square pada umur kalus ke-2 sampai ke-4 memberikan hasil nilai chi square hitung lebih rendah dari nilai chi square tabel sehingga dapat dinyatakan tidak ada perbedaan yang signifikan antara jumlah sel yang mengandung minyak atsiri pada umur kalus ke-2 sampai ke-4 pada media A, B, dan C. Pada umur kalus ke-5 diperoleh nilai chi square hitung sebesar 7,6250 dan nilai chi square tabel sebesar 5,991. Nilai chi square hitung lebih besar nilai chi square tabel berarti ada perbedaan yang signifikan antara jumlah sel yang mengandung minyak atsiri dari kalus yang tumbuh pada media A, B, dan C.

Dari data penelitian pada tabel 5.4 tentang berat basah kalus yang tumbuh pada media D, A, E dan berumur 1 bulan dilakukan analisis dengan Anava satu arah seperti pada tabel 5.8 di bawah ini.

Tabel 5.7. Ringkasan Anava satu arah berat basah kalus yang tumbuh pada media D, A, E dan berumur 1 bulan

| Sumber Keragaman | d.b | Jumlah Kuadrat | Kuadrat Tengah | F hitung | F tabel |
|------------------|-----|----------------|----------------|----------|---------|
| Perlakuan | 2 | 225861,9004 | 112930,9502 | 0,4229 | 3,21 |
| Galat | 42 | 11215024,2000 | 267024,3858 | | |
| Total | 44 | 11440886,1000 | | | |

Tabel ringkasan di atas menunjukkan nilai F hitung lebih kecil dari nilai F tabel, berarti tidak ada perbedaan yang signifikan antara berat basah kalus yang tumbuh pada media D, A, dan E pada umur satu bulan.

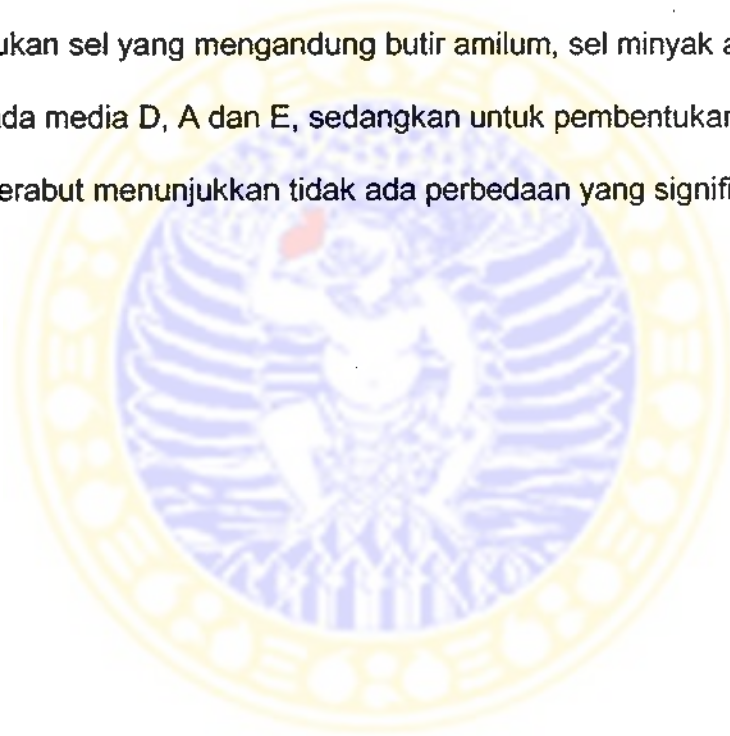
Data tentang pembentukan sel minyak atsiri dan sel yang mengandung butir amilum pada tabel 5.5 dianalisis dengan metode chi square. Dari hasil analisis diperoleh nilai Chi square hitung untuk pembentukan butir amilum sebesar 0,000 dan nilai chi square tabel $X^2_{0,05, (1)}$ lebih besar dari nilai chi square hitung yaitu sebesar 3,481. Nilai Chi square hitung untuk pembentukan minyak atsiri sebesar 0,000 dan nilai chi square tabel $X^2_{0,05, (1)}$ lebih besar dari nilai chi square hitung yaitu sebesar 3,481. Berhubung nilai chi square hitung untuk pembentukan butir amilum dan minyak atsiri lebih kecil dari nilai chi square tabel maka tidak ada perbedaan yang signifikan dalam pembentukan sel yang mengandung minyak atsiri dan sel yang mengandung butir amilum pada media D, A dan E.

Data tentang komposisi kalus yang berumur 1 bulan pada media D, A, E juga dianalisis dengan metode Chi Square. Dari hasil analisis Chi square diperoleh nilai chi square hitung dan nilai chi square tabel seperti pada table 5.9 di bawah ini.

Tabel 5.8. Hasil perhitungan Chi Square komposisi kalus berumur 1 bulan pada media D, A, dan E

| Diferensiasi | Nilai Chi square hitung | Nilai chi square tabel |
|-------------------|----------------------------|---------------------------|
| Sel Parenkima | 0,6434 | 5,991 |
| Butir Amilum | 18,3000 | 5,991 |
| Sel Minyak Atsiri | 9,0833 | 5,991 |
| Sel Trakea | 25,6154 | 5,991 |
| Sel Serabut | 2,6667 | 5,991 |

Hasil analisis data memperoleh nilai chi square hitung lebih besar dari nilai chi square tabel untuk pembentukan sel yang mengandung butir amilum, sel minyak atsiri dan sel trakea. Dengan demikian ada perbedaan yang signifikan dalam pembentukan sel yang mengandung butir amilum, sel minyak atsiri dan sel trakea pada media D, A dan E, sedangkan untuk pembentukan sel parenkima dan sel serabut menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan.



BAB VI

PEMBAHASAN

6.1 Penelitian Eksploratorik

6.1.1 Seleksi eksplan untuk induksi kalus temu giring

Untuk induksi kalus diperlukan eksplan yang mempunyai kemampuan untuk membelah. Menurut Yeoman & Macleod, (1977); Evans et.al., (1989) dalam Yeoman (1986) dan Sadhu (1989) bagian yang lebih muda akan lebih mudah menghasilkan kalus. Dalam penelitian ini sebagai bahan untuk seleksi eksplan digunakan tunas rimpang temu giring yang panjangnya kurang lebih 2 cm dipotong menjadi 3 bagian yaitu bagian ujung, tengah dan pangkal. Selain eksplan, medium juga menentukan pertumbuhan kalus. Menurut penelitian Margono dan Kartini pada tahun 1996 medium MS yang ditambah NAA 5 mg/l + BAP 0,5 mg/l serta sukrosa 30 g/l (dalam penelitian ini disebut medium A) dapat menghasilkan kalus untuk temu giring. Respons dari ketiga eksplan yang ditanam pada medium tersebut di atas tersignifikan tidak sama. Bagian ujung dan tengah dari tunas temu giring hanya menunjukkan pertumbuhan terbatas sedangkan bagian pangkal dapat menghasilkan planlet dan kalus dapat dilihat pada gambar 5.1. Dengan demikian sesuai dengan pendapat Syamsuhidayat (1991) yang mesignifikankan bahwa temu giring termasuk tumbuhan monokotil yang berbatang semu dan berumbi batang, di kanan kirinya tumbuh rimpang. Temu giring tidak menampakkan

pertumbuhan batang yang tegak karena berbentuk rimpang, sehingga tunas yang tumbuh tegak sebenarnya adalah batang dengan ruas-ruas yang pendek dibungkus oleh pelepah daun yang tumbuh memanjang. Letak meristem ujung batang ada di pangkal tunas sehingga bagian tengah dan ujung tunas merupakan calon pelepah dan helaian daun. Oleh karena itu hasil penelitian tahap eksploratorik ini mendapatkan pangkal tunas sebagai eksplan terpilih karena paling potensial untuk tumbuh baik dalam hal membentuk kalus maupun planlet.

Dari hasil pengamatan tampak bahwa pada medium A bagian ujung dan tengah hanya menggelembung kemudian membuka dan tidak menghasilkan kalus yang banyak dapat dilihat pada tabel 5.1. Kalus tampak tumbuh pada bagian tempat terjadi perlukaan tetapi tidak cukup banyak dan cepat mati. Lama-kelamaan eksplan coklat dan berhenti pertumbuhannya. Bagian pangkal karena banyak bidang perlukaannya tampak menghasilkan kalus pada bagian yang terluka dan ujungnya tumbuh memanjang menghasilkan daun lama-kelamaan tumbuh akar dan menjadi planlet. Semua bagian tubuh tumbuhan sebenarnya mempunyai totipotensi tanpa memperhatikan asalnya akan tetapi jika dilakukan kultur in vitro bagian yang lebih muda akan lebih mudah tumbuh sesuai dengan pendapat Yeoman (1986), Stafford and Warren (1991). Daun mempunyai pertumbuhan yang terbatas dibanding dengan ujung batang sehingga cepat mati. Pangkal tunas merupakan bagian yang mengandung sel – sel meristematik paling banyak sehingga lebih mudah tumbuh.

Kalus adalah hasil pertumbuhan yang tidak terorganisasi dan merupakan kumpulan sel yang belum mengalami diferensiasi serta sel-sel yang sudah berdiferensiasi. Selain itu kalus biasanya muncul pada daerah yang mengalami perlukaan (Pierik, 1989; Albert, 1981; Wetherell, 1982). Dengan demikian munculnya kalus pada bagian pangkal tunas temu giring sesuai dengan pendapat Pierik (1989) dan Yeoman (1986). Selain tumbuh kalus pada pangkal tunas yang dikultur juga tumbuh planlet (gambar 5.1) yang berarti meristem ujung dari eksplan masih aktif. Menurut Pierik (1989) monokotil sulit menghasilkan kalus. Untuk menghasilkan kalus diperlukan stimulasi hormon yang termasuk auksin. Pada penelitian ini medium A mengandung NAA 5mg /l dan BAP 0,5 mg/l. NAA merupakan salah satu anggota kelompok auksin sedang BAP termasuk sitokinin. Perbandingan antara auksin dan sitokinin adalah 5 : 0,5 sehingga pengaruh auksin lebih kuat. Sitokinin diperlukan untuk memelihara pembelahan sel. Menurut penelitian sebelumnya oleh Margono dan Kartini (1997) penggunaan 2,4 D dapat memacu pembentukan kalus pada temu giring tetapi tidak terdapat sel minyak atsiri dalam kalus tersebut. Pemberian NAA pada kultur *in vitro* biasanya akan memacu pembentukan akar. Rimpang temu giring merupakan bagian tumbuhan yang paling banyak mengandung sel minyak atsiri (Anonim, 1989). Selain itu status eksplan temu giring yang digunakan dalam keadaan aktif membelah sehingga mudah dipacu untuk menghasilkan kalus. Sesuai dengan pendapat Collin & Edwards (1998) yang mesignifikankan bahwa status eksplan menentukan respons terhadap pertumbuhan.

Untuk meyakinkan pengamatan terhadap sel minyak atsiri dilakukan perbandingan struktur anatomi rimpang temu giring dan struktur anatomi planlet dengan sel penyusun kalus. Hasil pengamatan terhadap penampang melintang rimpang temu giring menunjukkan adanya sel-sel parenkima yang tidak reaktif terhadap larutan sudan III dalam alkohol tetapi dindingnya berwarna biru jika diberi larutan biru metilen. Tanpa larutan sudan III minyak atsiri berwarna kuning muda sampai kuning kehijauan. Minyak atsiri yang bereaksi dengan sudan III tampak berwarna merah, sesuai dengan pendapat Evans (1989). Bentuk sel minyak atsiri agak berbeda dengan sel parenkima di sekitarnya. Sel minyak atsiri tampak lebih bulat dibanding sel parenkima. Pengamatan di atas menggunakan mikroskop cahaya (labophot 2). Penggunaan mikroskop fluoresen menunjukkan perbedaan visual antara dinding sel dan minyak atsiri. Dinding sel menimbulkan pendaran berwarna merah muda karena mengandung karbohidrat yang jika dilihat dengan sinar biru menggunakan filter BV-2A berwarna merah muda sesuai dengan standart dari mikroskop fluoresen sedangkan minyak atsiri menampakkan pendaran berwarna kekuningan. Pengamatan terhadap bentuk sel digunakan untuk menetapkan sel minyak atsiri yang terdapat dalam kalus.

6.1.2 Seleksi medium untuk pertumbuhan dan perkembangan kalus temu giring

Hasil penimbangan berat basah kalus yang tumbuh pada media A, B, dan C setiap minggu (dapat dilihat pada gambar 5.5) menunjukkan kurva sigmoid dan kalus sudah mengalami kontaminasi pada minggu ke enam kemungkinan kalus masih melakukan adaptasi. Pada minggu keenam kalus yang tumbuh pada medium A masih ada kecenderungan untuk bertambah berat sedang kalus yang tumbuh pada medium B dan C cenderung turun. Hasil analisis statistik terhadap berat basah kalus yang tumbuh pada media A, B, dan C menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan (lihat lampiran). Dengan demikian sebenarnya ketiga medium dapat digunakan untuk induksi kalus temu giring, tetapi melihat grafik pertumbuhan medium A lebih baik dibanding medium B dan C.

Untuk kalus-kalus yang tidak mengalami kontaminasi dilakukan pengamatan mikroskopik. Dalam kalus yang tumbuh pada medium A minyak atsiri sudah terbentuk pada umur setengah bulan sedang dalam kalus yang dihasilkan oleh medium B dan C minyak atsiri baru tampak dalam kalus yang paling sedikit berumur dua bulan dapat dilihat pada tabel 5.2. Hasil analisis statistik menunjukkan terjadi perbedaan pembentukan minyak atsiri pada kalus yang berumur lebih dari 4 bulan, sehingga untuk kalus yang berumur di bawah 4 bulan tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan. Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa umur kalus berpengaruh terhadap pembentukan sel minyak atsiri.

Secara makroskopik kalus yang tumbuh pada ketiga media A, B, dan C hampir sama tampak pada gambar 5.6. Warna kalus dapat putih bening, putih keruh, kuning atau coklat dengan konsistensi lembek, remah atau keras. Pengamatan mikroskopik terhadap kandungan minyak atsiri kalus menunjukkan bahwa kalus yang berwarna kuning atau coklat belum tentu mengandung minyak atsiri. Warna minyak atsiri dalam rimpang kuning kehijauan sehingga kalus yang berwarna kuning atau coklat diduga mengandung minyak atsiri. Kalus yang remah kebanyakan tidak mengandung mengandung minyak atsiri lebih banyak daripada kalus yang lembek atau keras. Pada umumnya kalus yang berwarna coklat menunjukkan program kematian (Burgess, 1985), tetapi dalam penelitian ini kadang – kadang dari kalus yang berwarna coklat tadi tumbuh kalus berwarna putih, bahkan kadang – kadang mengandung minyak atsiri.

Kalau dilihat dari komposisi mediumnya, medium A lebih banyak mengandung amonium dibanding medium B dan C. Medium B mengandung KCl sedang medium A dan C tidak. Pertumbuhan kalus dalam ketiga medium secara morfologi tidak menunjukkan perbedaan yang mencolok. Di samping itu analisis statistik terhadap penambahan berat basah kalus tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan. Akan tetapi kalau dilihat secara mikroskopik medium A menghasilkan kalus yang mengandung minyak atsiri pada umur paling muda dibanding medium B dan C. Ketiga medium sama-sama menghasilkan sel penyusun kalus yang mengandung butir – butir amilum dan pembentukan butir amilum lebih dahulu dibandingkan dengan

pembentukan minyak atsiri. Kemungkinan butir amilum digunakan sebagai bahan dasar minyak atsiri sesuai dengan pendapat Bidwell (1979). Medium A terpilih sebagai medium untuk pertumbuhan kalus karena dapat menghasilkan sel minyak atsiri lebih cepat dibanding dengan medium B dan C. Dari penelitian ini juga ditemukan bahwa proses pembentukan minyak atsiri memerlukan waktu yang lama karena baik pada kalus yang tumbuh pada medium A, B, maupun C dapat menghasilkan minyak atsiri setelah berumur 2 bulan atau lebih. Dodds & Robert (1995) mengatakan bahwa pembentukan metabolit sekunder seperti minyak atsiri ini memerlukan waktu untuk diferensiasi. Pada temu giring rupanya pembentukan minyak atsiri sejalan dengan diferensiasi seperti yang dikatakan oleh Dodds & Robert (1995) tadi. Hasil penelitian ini juga menunjukkan bahwa meskipun secara morfologis sel mempunyai bentuk yang sama tetapi kemampuan fisiologisnya berbeda seperti yang dikatakan oleh Greulach (1973).

Menurut Dodds & Roberts (1995) sel akan menghasilkan turunan yang mirip dengan induknya. Oleh karena itu kalus yang tumbuh pada medium A dapat digunakan untuk eksplan berikutnya. Kalus yang digunakan sebagai eksplan adalah kalus yang berumur 1 bulan, berwarna putih bening, remah dan sudah mengandung butir amilum. Diharapkan kalus yang tumbuh pada penelitian berikutnya dapat menghasilkan sel-sel yang mengandung minyak atsiri.

6.2 Penelitian Dengan Skala Penuh

6.2.1 Pengaruh sukrosa terhadap perkembangan kalus temu giring

Kalus yang dikultur pada medium A, D, E menunjukkan bahwa kadar sukrosa yang tinggi cenderung menaikkan berat basah kalus. Berarti sukrosa dapat memacu pertumbuhan atau penambahan masa kalus. Akan tetapi menurut analisis statistik perbedaan berat basah kalus yang tumbuh dari ketiga medium tidak signifikan. Perbedaan terjadi pada pembentukan butir amilum. Kalus yang tumbuh pada medium D dengan kadar sukrosa 20 g/l sampai dengan minggu ke 6 tidak menghasilkan butir amilum maupun minyak atsiri. Dalam kalus yang tumbuh pada medium A dan E mulai terbentuk butir amilum pada minggu kedua dan minyak atsiri mulai tampak pada minggu ketiga. Eksplan yang digunakan pada penelitian dengan skala penuh ini adalah kalus yang tumbuh pada medium A penelitian tahap eksploratorik dengan umur satu bulan dan sudah mengandung butir amilum. Hasil penelitian subkultur pada medium D dengan penurunan kadar sukrosa dari 30 g/l menjadi 20 g/l menunjukkan bahwa kalus menjadi muda kembali pada umur yang sama yaitu 2 minggu belum menghasilkan butir amilum atau minyak atsiri bahkan pada minggu keenam tetap menunjukkan sel parenkima yang tidak berdiferensiasi dapat dilihat pada tabel 5.5. Menurut Esau (1977) sel meskipun sudah mengalami diferensiasi dapat diubah menjadi meristematik kembali sehingga mempunyai kemampuan membelah lagi seperti pada pembentukan kalus temu giring secara *in vitro* ini. Butir amilum

yang ada di dalam eksplan dibongkar lagi dan tenaganya untuk pembelahan sel.

Dilihat secara makroskopik tidak ada perbedaan secara morfologik pada kalus yang tumbuh pada medium A, D, E (gambar 5.8) tetapi kalus yang tumbuh pada medium E tampak lebih cepat mati. Komposisi sel dalam kalus yang tumbuh pada medium D, A, dan E menunjukkan bahwa jumlah sel parenkima dalam kalus yang dihasilkan oleh medium D paling banyak yaitu 71,85 % sedangkan kalus dari medium A mengandung parenkima sebanyak 65,70 % dan kalus dari medium E mengandung parenkima sebanyak 69,60 % tampak pada tabel 5.5. Perbedaan jumlah ini tidak signifikan. Sel parenkima yang banyak menunjukkan bahwa pembelahan sel masih aktif. Selama sel mengalami pembelahan yang terjadi adalah penambahan jumlah masa sel dan sel-sel hasil pembelahan mempunyai sifat yang sama. Dalam perkembangan sel sel akan mengalami diferensiasi menjadi sel khusus dan mengalami kematian (Burgess,1985; Swanson,et al.,1980). Pembelahan sel, diferensiasi dan spesialisasi, serta kematian sel merupakan tahap-tahap pertumbuhan dan perkembangan yang terjadi secara bergantian (Esau, 1977). Salah satu contoh program kematian sel yang diperlukan oleh tumbuhan adalah pembentukan elemen trakeal (Greulah, 1973). Sel parenkima merupakan sel penyusun kalus yang terbesar (Pierik, 1987).

Jumlah sel yang mengandung butir amilum paling banyak pada kalus yang tumbuh pada medium A yaitu 14,05 % sedang pada medium D hanya

2,94 % dan pada medium E 8,37 %. Perbedaan jumlah sel yang mengandung butir amilum menunjukkan perbedaan yang signifikan, berarti ada kemungkinan butir amilum merupakan hasil metabolisme yang ditimbun di dalam sel sebagai cadangan makanan untuk diubah menjadi zat yang lain misalnya minyak atsiri. Kadar sukrosa pada medium A lebih tinggi dari medium D tetapi lebih rendah dari medium E sehingga sumber karbon yang tertinggi ada pada medium E. Kadar sukrosa 40 g/l mengurangi produksi amilum. Kemungkinan sukrosa digunakan untuk pembentukan metabolit sekunder

Kalau dilihat dari jumlah sel yang mengandung minyak atsiri medium E paling banyak yaitu 13,66 % sedang medium A 11,98 %, dan medium D hanya 5,04 %. Analisis statistik untuk perbedaan sel minyak atsiri menunjukkan hasil yang signifikan (lihat lampiran). Kemungkinan kecepatan metabolisme perubahan dari amilum ke minyak atsiri paling banyak terjadi pada medium E karena sumber karbonnya paling banyak. Kemungkinan sukrosa digunakan untuk diferensiasi yang lain seperti pembentukan dinding sel.

Sel trakea paling banyak terbentuk dalam kalus yang tumbuh pada medium D yaitu 19,75 % sedang dalam medium A hanya 7,02 % dan medium E hanya 6,17 %. Hasil analisis statistik terhadap jumlah sel trakea menunjukkan perbedaan yang signifikan. Menurut Bidwell (1979) kadar gula yang rendah memacu pembentukan elemen trakeal dalam xilem. Dengan demikian hasil penelitian ini sesuai dengan pendapat Bidwell karena makin

tinggi kadar sukrosa makin sedikit jumlah trakea yang terbentuk. Selain itu terbentuknya elemen trakea menunjukkan penggunaan sukrosa untuk sintesis dinding sel.

Kalus yang dihasilkan oleh medium D mengandung sel serabut 0,004 persen sedangkan kalus dari medium A mengandung sel serabut 1,24 % dan kalus dari medium E membentuk sel serabut 2,20 %. Jumlah sel serabut makin banyak terdapat dalam kalus yang tumbuh dalam medium dengan kadar sukrosa yang makin tinggi tetapi kenaikan jumlah sel serabut hanya sedikit sekali dan hasil analisis statistiknya menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan.

Kalus yang tumbuh pada medium E memang tampak lebih banyak mengandung minyak atsiri meskipun belum mampu dibuktikan secara kuantitatif karena kalus yang dihasilkan masih terlalu sedikit. Kelemahan lain dari kalus yang tumbuh pada medium E ini lebih cepat mati sehingga sulit untuk disubkultur. Pembentukan minyak atsiri dalam kalus yang tumbuh pada medium E juga tidak lebih cepat dibandingkan dengan kalus yang tumbuh pada medium A, dengan demikian memang diperlukan waktu untuk pembentukan minyak atsiri karena seperti telah disebutkan tadi bahwa pertumbuhan minyak atsiri harus melalui pembentukan butir amilum terlebih dahulu.

Kemungkinan yang lain sukrosa bukan merupakan prekursor bagi pembentukan minyak atsiri pada kalus temu giring. Menurut Johnson, Ravisankar dan Ventakarman (1995) pembentukan capsaicin memerlukan

asam ferulat bukan sukrosa. Medium yang digunakan mungkin juga perlu diperbaharui sesuai dengan penelitian Figuiredo et al (1994) tentang komposisi minyak atsiri pada *Achillea millefolium* ssp *millefolium* juga mengandung sesquiterpen hampir 40 % . Penelitian Figuiredo tidak menggunakan medium MS tetapi menggunakan medium B5 dengan penyinaran 2000 lux dan lama penyinaran sepanjang hari sedangkan pada penelitian ini menggunakan penyinaran 40 watt/m² yang setara dengan penyinaran 740 lux selama 18 jam terang dan 6 jam gelap. Dengan demikian masih perlu dicermati tentang penambahan zat prekursor, lama penyinaran dan intensitas sinarnya.

Kadar sukrosa yang tinggi juga menyebabkan stres terhadap kekeringan sehingga kemungkinan cepat matinya kalus karena kesulitan menyerap zat-zat hara dari medium yang disebabkan adanya tekanan osmosis di luar sel yang lebih tinggi dari tekanan osmosis di dalam sel. Akan tetapi jika kadar minyak atsiri dalam kalus tinggi meskipun sel kalus tidak cepat mati tidak bermasalah karena kalus dapat segera dipanen. Dari morfologi kalus jika kalus bening transparan dan remah tumbuhnya cepat sedang kalus yang putih susu banyak mengandung butir amilum pertumbuhannya kurang cepat. Kalus yang sudah tua tampak sedikit coklat biasanya mengandung minyak atsiri tetapi kadang-kadang warna coklat menunjukkan tanda kematian dari kalus.

Selain kandungan minyak atsirinya kalus yang tumbuh pada medium E mempunyai sel yang panjang-panjang dan menyerupai serabut tampak pada

gambar 5.10. Di dalam sel yang panjang tersebut tampak tetes-tetes minyak atsiri yang lebih banyak dibandingkan dengan sel-sel yang berbentuk isodiametris karena biasanya sel yang berbentuk isodiametris lebih muda umurnya dibandingkan dengan sel yang berbentuk panjang sehingga belum mengalami proses pertumbuhan yang optimal. Akan tetapi tidak semua sel isodiametrik berkembang menjadi sel panjang.

Rekaman fotomikrograf dari kalus yang tumbuh pada medium A dan medium E menunjukkan adanya sel yang mengandung minyak atsiri saja, butir amilum saja atau minyak atsiri dan butir amilum terdapat bersamaan dalam satu sel tampak pada gambar 5.9. Menurut Firman et al. (1989) dan Zwaving & Bos (1990) komposisi minyak atsiri pada *Curcuma heyneana* adalah senyawa sesquiterpena. Ada kemungkinan bahwa sukrosa yang ditambahkan dalam medium merupakan sumber karbon bagi kalus dan mempengaruhi kerja enzima dalam tumbuhan seperti pendapat Ehness, et al (1997). Selain itu adanya karbon oleh tumbuhan akan diubah menjadi amilum seperti pada peristiwa fotosintesis *in vivo*. Perubahan dari amilum menjadi minyak atsiri yang sebagian besar adalah sesquiterpen mungkin saja terjadi karena menurut Bidwell (1979) amilum dalam sel akan dihidrolisis menjadi glukosa yang melalui jalur tertentu akan menjadi terpena (gambar 2.1). Pendapat itu juga dikemukakan oleh Evans & Trease (1989). Dengan demikian sukrosa selain diperlukan untuk pertumbuhan mungkin juga diperlukan untuk pembentukan minyak atsiri pada *Curcuma heyneana* Val & van Zijp. Dalam pembentukan metabolit sekunder melalui kultur *in vitro* masih

sulit karena pada umumnya metabolit sekunder dibentuk dalam organ tertentu misal pembentukan mentol yang terjadi dalam trikoma glandular dari daun *Mentha piperita*. Menurut Evans pembentukan metabolit sekundernya harus melalui tahap pembentukan trikoma glanduler terlebih dahulu. Pada *Curcuma heyneana* Val & van Zijp minyak atsiri terdapat pada sel minyak atsiri yang secara mikroskopik hampir tidak tampak adanya perbedaan antara sel parenkima dengan sel prekursor minyak atsiri dalam kalus. Tidak semua sel mempunyai kemampuan untuk membentuk minyak atsiri. Dari pengamatan mikroskopik terhadap komponen kallus temu giring dengan atau tanpa menggunakan pereaksi sudah tampak bahwa tidak semua sel menjadi sel minyak atsiri. Pengamatan mikroskopik belum mampu mendeteksi sel kompeten yang akan menjadi sel prekursor minyak atsiri.

Analisis kromatografi gas (GC-MS) dari hasil destilasi dengan alat destilasi uap berkesinambungan modifikasi Likens – Nickerson menunjukkan bahwa kandungan minyak atsiri dari kalus yang berumur satu bulan tidak sama dengan hasil destilasi rimpang dan planlet. Rimpang dan planlet mengandung terpena sedang kalus tidak mengandung senyawa terpena. Kemungkinan diperlukan waktu yang lebih lama untuk membentuk senyawa terpena dalam kalus temu giring. Menurut Nugroho (2002) melalui jalur mevalonat (gambar 2.3) pembentukan terpena dapat melalui kolesterol dulu tergantung enzimnya. Analisis kromatografi gas dari kalus temu giring memungkinkan adanya senyawa steroid (lihat lampiran). Selain itu dalam produksi metabolit sekunder melalui kultur kalus mungkin didapat suatu

senyawa yang sama dengan senyawa yang diproduksi oleh tanaman induk tetapi kadarnya berbeda. Mungkin juga terdapat senyawa yang diproduksi oleh tanaman induk di dalam kalus hasil kultur *in vitro*, seperti yang terjadi pada kalus temu giring ini. Faktor-faktor yang mempengaruhi terbentuknya senyawa metabolit sekunder sangat banyak terutama unsur-unsur dalam medium, zat pengatur tumbuh dan sebagainya.

6.2.2 Pengaruh asam giberelat terhadap pertumbuhan kalus temu giring.

Pertumbuhan kalus pada medium F dan G tidak menunjukkan perbedaan yang mencolok, kalus keras kemudian menampilkan warna hijau, setelah itu berubah menjadi coklat dan tumbuh tunas dapat dilihat pada gambar 5.12. Tunas pada medium G lebih banyak tetapi mengalami vitrifikasi kemungkinan karena terjadi penyerapan air melalui seluruh bagian tunas. Tunas yang dihasilkan relatif banyak, menurut Street & Opik (1984) giberelin dapat memacu enzima amilase untuk menghidrolisis amilum menjadi glukosa dan energinya untuk pembelahan sel waktu biji berkecambah. Dalam penelitian ini glukosa hasil hidrolisis amilum tadi yang diharapkan untuk memacu pembentukan minyak atsiri mungkin digunakan untuk pembelahan sel dan diferensiasi morfologik..

Di dalam kalus temu giring yang tumbuh pada medium G banyak ditemukan elemen trakeida (gambar 5.13) yang menunjukkan diferensiasi ke arah program kematian sel karena kematian sel diperlukan untuk mengganti kerusakan organ. Diferensiasi sel dalam penelitian ini tampaknya menuju ke

arah organisasi dengan terjadinya tahap-tahap embrioid seperti tahap globular, dan tahap jantung yang umum terjadi pada embrio somatik dapat dilihat pada gambar 5.14. Calon sel minyak atsiri dapat ditemukan pada stadium embrio bentuk jantung. Jadi meskipun sel minyak atsiri tidak dibentuk dalam organ khusus tetapi dibentuk oleh sel khusus yang terdapat dalam tahap diferensiasi tertentu. Embrio somatik akan membentuk planlet. Peristiwa ini sesuai dengan pendapat Burges (1985). Berlawanan dengan penelitian tentang penambahan giberelin yang dapat memacu pembentukan minyak atsiri pada beberapa tumbuhan seperti yang dikemukakan oleh Evans (1989). Kemungkinan tidak terbentuknya minyak atsiri dalam penelitian ini karena belum didapat kombinasi hormon yang tepat antara auksin, sitokinin dan giberelin. Pembentukan minyak atsiri pada kalus temu giring tidak memerlukan suatu bentukan organ khusus misalnya seperti trikoma glanduler pada *Mentha piperita* seperti yang dikatakan oleh Evans (1989) tetapi sel khusus yaitu sel minyak atsiri. Kemungkinan lain sintesis minyak atsiri membutuhkan prekursor lain selain sukrosa.

Keseluruhan hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kalus yang selama ini dianggap sebagai suatu masa yang homogen dan tidak terorganisir tersignifikan sangat heterogen dan bersifat sebagai suatu sistem yang terorganisir serta bersifat homeostatis. Selain itu suatu konsep sel turunan yang mirip dengan induknya akan dihasilkan jika suatu sel dikultur dalam medium yang sama ternyata tidak selalu demikian.

BAB VII

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Dalam penelitian ini didapat hasil-hasil sebagai berikut:

1. Kalus temu giring ternyata heterogen dan bersifat homeostatik..
2. Medium A merupakan medium yang sesuai untuk induksi kalus temu giring.
3. Sukrosa bukan merupakan prekursor minyak atsiri pada temu giring.
4. Pembentukan sel minyak atsiri terjadi setelah kalus yang mengalami diferensiasi.
5. Pembentukan sel minyak atsiri pada kalus temu giring tergantung pada kondisi medium.
6. Asam giberelat tidak mempercepat pembentukan minyak atsiri tetapi memacu perkembangan embrio somatik untuk tumbuh menjadi planlet.

7.2 Saran

1. Masih perlu dicermati komposisi zat pengatur tumbuh yang tepat untuk memacu pembentukan sel minyak atsiri.
2. Jika ingin diproduksi minyak atsiri temu giring sebaiknya difokuskan pada medium yang dirancang untuk memperpanjang umur kalus dengan masa sel yang didominasi oleh sel tua. NAA merupakan zat pengatur tumbuh yang memacu perkembangan sel minyak atsiri.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 1989. **Materia medika**. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta. Hal. 169-171
- Albert B, Bray D, Lewis J, Raff M, Robert K, Watson JD, 1983. **Molecular biology of the cell**. Garland Publishing Inc. New York and London. pp 1140.
- Bidwell RGS. 1979. **Plant physiology**. Second Edition. Collin Mac Millan. Publisher. London. pp: 121,261.
- Briggs WR, Green PB, Jones RL. 1974. **Annual review of plant physiology**. Vol 25. Annual Reviews Inc. Palo Alto California. pp:152, 156-157.
- Burgess J, 1985. **Plant cell development**. Cambridge University press. Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney pp 1- 3.
- Charlwood KA, Brown S, Charlwood BV. 1988. **The accumulation of flavour compound by cultures of *zingiber officinale*** dalam Robin RJ and Rhodes JC. **Manipulating secondary metabolism in culture**. Cambridge University Press. New York – New Rochelle – Melbourne-Sydney. pp: 195-200.
- Claus EP, Tyler VE, Brady LR. 1970. **Pharmacognosy**. Sixth Edition. Lea and Febiger. Philadelphia. pp: 160-161.
- Collin HA and Edwards S. 1998. **Plant cell culture**. Bios. Scientific Publishers Limited. Singapore. Pp:27-28.
- Darwis SN, Madjo Indo, ABD. Hasiyah S.1991. **Tumbuhan obat famili Zingiberaceae**. Badan Penelitian Pengembangan Pertanian. Pusat Penelitian dan Pengembangan Tanaman Industri. Bogor.
- Dixon RA and Gonzales RA, 1993. **Plant cell culture a practical approach**. Oxford University Press. Oxford – New York – Tokyo. pp: 16.
- Dodds JH and Robert SLW, 1995. **Experiment in – plant tissue culture**. Third Edition. Cambridge University Press. New York. pp: 4, 46-54,69-73,204-208.
- Elliot DC, 1982. **Accumulation of cytokinin – induced betacyanin in specific cells of *Amaranthus tricolor***. Seedlings. Experimental Botany Vol 34, no. 138. pp: 67-73.

- Ehness R, Ecker M, Godt DE, Roitsch TD, 1997. **Glucose and stress independently regulate source and sink metabolism and defense mechanism via signal transduction pathways involving protein phosphorylation.** *The Plant Cell*. Vol 9. pp: 1825-1842.
- Esau K. 1977. **Anatomy of seed plants.** Second Edition. John Wiley and Sons Inc. Singapore. Pp 8- 15.
- Evans WC, 1989. **Trease and Evans pharmacognosy.** Thirteenth Edition. English Language Book Society Bailliere Tindall, London. pp: 274, 114-115.
- Fahn A, 1990. **Plant anatomy.** Fourth Edition. Pergamon Press. Oxford, New York, Beijing, Sao Paulo, Sydney, Toronto. P 50.
- Figueredo AC, Salome M, Pais S, Scheffer JJC, 1995. **Composition of the essential oil from cell suspension culture of *Achillea millefolium* ssp *millefolium*.** *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 40. pp: 113-118.
- Firman K, Kinoshita T, Itai A and Satikawa U, 1988. **Terpenoid from *Curcuma heyneana*.** *Phytochemistry* 27. pp: 12,3887-3891.
- Fukuda H, 1997. **Tracheary element differentiation.** *Plant Cell* Vol 9. pp: 1114-1156.
- Gacula MC Jr. and Singh J, 1984. **Statistical method in food and consumer research.** Academic Press. Orlando – San Diego – New York – London – Toronto – Montreal – Sidney – Tokyo. pp: 176-208.
- Gardner FP, Parce RB, Mitchell RL, 1985. **Physiology of crop plants.** The Iowa State University Press. Iowa Pp 188, 197.
- George EF, Puttock DJM, George HJ, 1987. **Plant culture media.** Vol 1. Formulator and Uses. The Eastern. Press Ltd. Reading – Berks. pp: 10-11, 26-27.
- George EF and Sherington PD, 1984. **Plant propagation by tissue culture.** The Eastern Press Ltd. Reading – Berks. pp: 10-11, 26-27.
- Gomez KA and Gomez AA, 1984. **Statistical procedures for agriculture research.** Second edition. John Wiley and Son. New York-Chichester-Brisbane-Toronto. Singapore. pp: 89-97,208-215.
- Grant P, 1978. **Biology of developing system.** Holt, Reinhart and Winston-New York- San Fransisco-Chicago-Atlanta-Dallas-Montreal-Toronto-London-Sydney. pp:542.

- Greulach VA, 1973. **Plant function and structure**. Macmillan Publishing Co, Inc. New York. Pp 530-532.
- Guruprasad KN and Laloraya MM, 1976. **Betacyanin biosynthesis in the isolated of *Amaranthus caudatus***. *Planta* 30:185-188.
- Hidayat SN, 1989. **Daya antelmintika rebusan rimpang temu giring (*Curcuma heyneana* Val & Zijp) Terhadap *Ascaridia galli* Schrank in vitro**. Skripsi Fakultas Farmasi UGM. Yogyakarta. Tidak diterbitkan.
- Hoesen DSH. dan Poerba YS, 1992. **Perbanyakkan tanaman jahe merah (*Zingiber officinale*. Var. *Rubra*. Rosc) dengan teknik kultur jaringan**. Balai Penelitian dan Pengembangan Botani. Pusat Penelitian dan Pengembangan. Biologi-LIPI. Bogor. Hal. 324-328.
- Imelda M, 1994. **Penyediaan bibit jahe gajah dengan teknologi biak jaringan**. Pusat Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi-LIPI-Bogor. Hal 335-339.
- Johnson CB, 1981. **Physiological processes limiting plant productivity**. Butterworths- London- Boston- Sydney- Wellington- Dublin- Toronto. P. 11.
- Johnson TS, Ravisankar GA, and Ventakarman LV, 1996. **Biotransformation of ferulic acid and vanillylamine to capsaicin and vanillin in immobilized cell culture of *Capsicum frutescens***. *Plant cell, tissue and organ culture* 44: 19-24.
- Kartini E, 1995. **Budidaya in vitro temu lawak (*Curcuma xanthorrhiza*) dan temu giring (*Curcuma heyneana*)**. Laporan Penelitian. Laboratorium Kultur Jaringan Fakultas Biologi-UGM. Yogyakarta. Tidak diterbitkan.
- Kende H & Zeevaldt JAD, 1997. **The five "classical" plant hormones**. *The plant cell* Vol 9: 1197 - 1203
- Kropf DL, 1997. **Introduction of polarity in fucoid zygote**. *Plant Cell*. pp: 9, 989-1000.
- Larkin JC, Marks MD, Nadeu J and Sack F, 1997. **Epidermal cell fate and patterning in leaves**. *Plant Cell*, Vol 9, 1109-1120.
- Lea PJ and Leegood RC, 1993. **Plant biochemistry and molecular biology**. John Wiley & Sons. Chichester – New York – Brisbane – Toronto – Singapore. Pp 83 -86.

- Luckner M, Nover L, Bohm H, 1977. **Secondary metabolism and cell differentiation**. Springer – Verlag – Berlin – Heidelberg – New York. Pp. 105, 113.
- Manuhara YSW, Suryowinoto M dan Soegihardjo CJ, 1995. **Kandungan alkaloid vinkristina kalus daun *Catharanthus roseus* (L) G. Don. pada berbagai komposisi media**. BPPS. UGM 8 (3B), Agustus: 394-404.
- Margono H dan Kartini, 1996. **Budidaya in vitro beserta aklimatisasi *Curcuma heyneana* Val & van Zijp penghasil sesquiterpena**. Laporan Penelitian Laboratorium Kultur Jaringan Tumbuhan IKIP Malang.
- Meyerowitz, 1997. **Genetic control of cell division pattern in developing plants**. Cell. 88, 299-308.
- Moore CT, 1989. **Biochemistry and physiology of plant hormones**. Second Edition. Springer – Verlag. New York – Heidelberg – Berlin – London-Parish – Tokyo – Hongkong. Pp 28-84, 158-159, 284.
- Murakami Y, Omoto T, Asai I, Shimomura K, Yoshihira K, and Ishimura K, 1998. **Rosmarinic acid and related phenolic in transformed root culture of *hyssopus officinalis***. Plant cell Tissue and organ Culture 53:75-78.
- Nugroho LH, 2002. **Metabolic profiling of salicylic acid producing transgenic tobacco plants**. Optima Grafische Communicative. Rotterdam. Pp. 9 –10.
- Panggabean G, 1993. **Pengaruh keasaman tanah terhadap pertumbuhan, produksi dan kandungan minyak atsiri rimpang jahe merah (*Zingiber officinale* var. *Rubra*. Rosc.)**. Proyek Penelitian Pengembanagn Sumber Daya Hayati. Pusat Penelitian pengembangan Biologi. Hal.123-127.
- Pennel RJ, Cronk QCB, Forsberg LS, Sthor C, Snogerup S, Kjellbom P, and Mc Cabe PF, 1995. **Cell context signalling phillos**. Trans R. Soc: London B350, 87-93.
- Perata P, Matsukara C, Vernieri P, Yamaguchi J, 1997. **Sugar repression of gibberelin – dependt signaling pathway in barley embryo**. The Plant Cell. Vol. 9. Pp: 2197-2208.
- Pierik RLM, 1987. **In vitro culture of higher plant**. Martinus Nijhoff Pub. Dordrecht – Boston – Lancaster. Pp: 60-62, 67-70, 87-88, 99, 107-111, 206, 214-217.

- Sadhu MK, 1989. **Plant propagation**. Wiley Eastern Limited. New Delhi _ Bangalore – Bombay – Calcuta – Madras – Hyderabad – Pune. Pp: 226, 233-234, 236.
- Selles MM, Bergonon S, Viladomat F, Bastida J, and Codina C, 1997. **Effect of sucrose on growth and galathamine production in shoot clump cultures of *Narcissus confusus* in liquid – shake medium**. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 49: 129-136.
- Setiawati MCN, 1986. **Isolasi dan pemeriksaan minyak atsiri dari *Curcuma heyneana* Val Zijp**. Skripsi Fakultas Farmasi UGM. Yogyakarta. Tidak diterbitkan.
- Simpson BB, and Ogorzaly MC, 1986. **Economic botany plants in our world**. McGraw-Hill Book Company. Singapore. P 257.
- Soegiharjo CJ, 1987. **Mencari kondisi terbaik bagi budidaya in vitro tanaman *Costus speciosus***. Laporan Penelitian Fakultas Farmasi UGM – Yogyakarta.
- Stafford A & Warren G, 1993. **Plant cell and tissue culture**. John Wiley & Sons. Chichester – New York – Brisbane – Toronto – Singapore. pp: 11-15.
- Street HE, & Opik H, 1984. **The physiology of flowering plants**. Third Edition. ELBS. Scotland. pp: 82-83,214.
- Swanson CP & Webster PL, 1980. **The Cell**. IVth Edition. Prentice Hall of India Private Limited. New Delhi. P. 251-254.
- Syamsuhidayat SS, dan Hutapea JR, 1991. **Inventarisasi tanaman obat Indonesia**. Jilid I. Departemen Kesehatan R. I. Jakarta hal 269.
- Thomas E and Davey MR, 1975. **From single cells to plants**. Wykeham Pub. Ltd. London and Winchester.
- Thorpe TA, 1978. **Plant tissue culture methods and application in agriculture**. Academic Press, Inc. Orlando – San Diego – New York – London – Toronto – Montreal – Sydney – Tokyo. pp: 66-69, 73,76,86.
- Tisserat B, 1985. **Embryogenesis, organogenesis and plant regeneration dalam Dixon, RA. Plant tissue culture**. IRL, Press Oxford – Washington DC. pp: 84,90-91,98.
- Tomes DT, Ellis BE, Harvey PM, Kasha KJ, Peterson RL, 1982. **Application of plant cell and tissue culture to agricultural and industry**. University of Guelph. Guelph- Ontario- Canada. Pp 61-72.

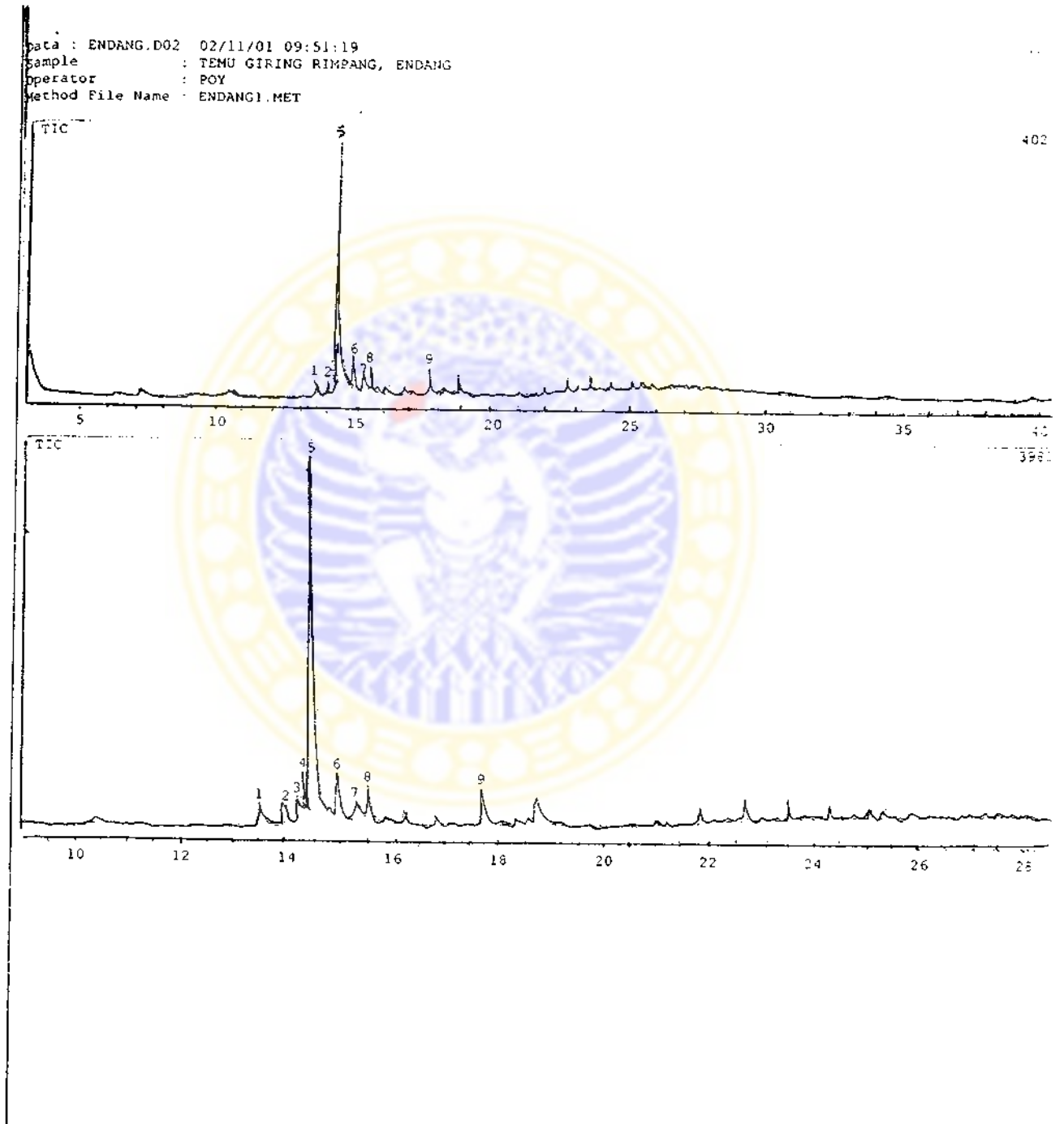
- Torres KC, 1989. **Tissue culture techniques for horticultural crops**. Van Nostrand Reinhold. New York. pp: 27,44,73-76,248.
- Uden VM, Bouma AS, Waker JFB, Middel O, Wickers HJ, Dewaard P, Woerdenburg HL, Kellog RM and Pras N, 1995. **The production of podophyllotoxin and it's methoxy derivative through bio-conversion of cyclodextrin – complexed desoxypodophyllotoxin by plant cell cultures**. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 42: 73-74.
- Verpoorte R and Alferman A W, 2000. **Metabolic engineering of plant secondary metabolism**. Kluwer Academic Publisers. Netherlands. Pp 1 – 19.
- Wetherell DF, 1982. **Introduction to in vitro propagation Avery publishing group Inc. USA**. Terjemahan Oleh Koensoemardijah. IKIP Semarang Press. Hal 20, 45-46, 86.
- Whitmer S, Verpoorte R and Canel C, 1998. **Influence of Cuxin on alkaloid accumulation by a transgenic cell line of *Catharanthus roseus* (L) G. Don**. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 53: 135-141.
- Yelnitis and Gati E, 1994. **Upaya pelestarian tanaman obat langka temu puteri melalui kultur jaringan**. Pusat Pengembangan Tanaman Industri Bogor.
- Yeoman MM, 1986. **Plant cell culture technology**. Blackwell Scientific Publications. Oxford – London – Edinburg – Boston – Palo Alto – Melbourne. pp 30, 33, 41, 149-150.
- Yeoman MM, and Forche E, 1980. **Cell proliferation and growth in callus cultures dalam Vasil, IK. Perpectives in plant cell and tissue culture**. Academic Press. New York – London – Toronto – Sydney – San Fransisco. pp 1, 4, 6, 13.
- Zabetakis J and Holden MA, 1996. **The effect of 6 deoxy d fructose on flavour biotranformation from strawberry (*Fragaria xananassa*, ev. *Elsanta*) callus cultures**. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 45: 25-29.
- Zwaving JH and Bos R, 1990. **Analysis of the essential oil of five curcuma species**. *Planta Medica*. 56:6, 529-530.

Lampiran I . Komposisi Medium A, B, C, D, E, F, G

Medium Penelitian

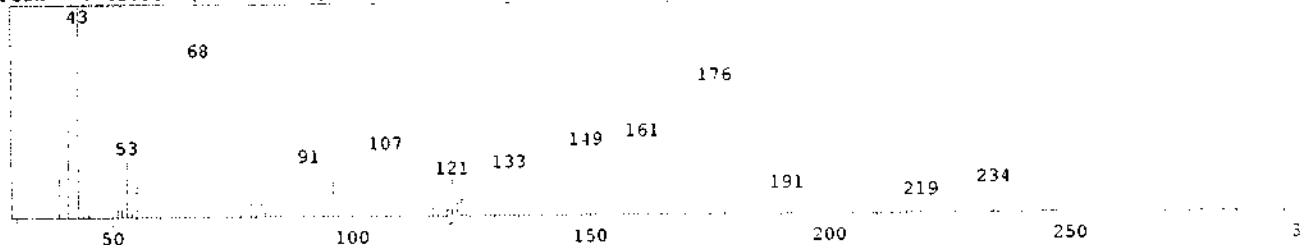
| Bahan | Medium eksploratorik | | | Medium untuk skala penuh | | | |
|---|----------------------|-----------------|-----------------|--------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | Medium A (mg/l) | Medium B (mg/l) | Medium C (mg/l) | Medium D (mg/l) | Medium E (mg/l) | Medium F (mg/l) | Medium G (mg/l) |
| NH ₄ NO ₃ | 1650,0 | 825,0 | 825,0 | 1650,0 | 1650,0 | 1650,0 | 1650,0 |
| KHO ₃ | 1950,0 | 1950,0 | 1950,0 | 1950,0 | 1950,0 | 1950,0 | 1950,0 |
| KH ₂ PO ₄ | 170,0 | 170,0 | 170,0 | 170,0 | 170,0 | 170,0 | 170,0 |
| H ₂ BO ₃ | 6,2 | 6,2 | 6,2 | 6,2 | 6,2 | 6,2 | 6,2 |
| KI | 0,83 | 0,83 | 0,83 | 0,83 | 0,83 | 0,83 | 0,83 |
| Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O | 0,25 | 0,25 | 0,25 | 0,25 | 0,25 | 0,25 | 0,25 |
| CoCL ₂ .2H ₂ O | 0,025 | 0,025 | 0,025 | 0,025 | 0,025 | 0,025 | 0,025 |
| CaCL ₂ .2H ₂ O | 440,0 | 440,0 | 440,0 | 440,0 | 440,0 | 440,0 | 440,0 |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 370,0 | 370,0 | 370,0 | 370,0 | 370,0 | 370,0 | 370,0 |
| MnSO ₄ .4H ₂ O | 16,9 | 16,9 | 16,9 | 16,9 | 16,9 | 16,9 | 16,9 |
| ZnSO ₄ .4H ₂ O | 8,6 | 8,6 | 8,6 | 8,6 | 8,6 | 8,6 | 8,6 |
| CUSO ₄ .5H ₂ O | 0,025 | 0,025 | 0,025 | 0,025 | 0,025 | 0,025 | 0,025 |
| Fe EDTA | 43,0 | 43,0 | 43,0 | 43,0 | 43,0 | 43,0 | 43,0 |
| KCl | - | 1950,0 | - | - | - | - | - |
| Myoinositol | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 |
| Thiamin | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| Pyridoxin | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| Niacin | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| Glycin | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 |
| Gula | 30000,0 | 30000,0 | 30000,0 | 30000,0 | 30000,0 | 30000,0 | 30000,0 |
| Agar | 7000,0 | 7000,0 | 7000,0 | 7000,0 | 7000,0 | 7000,0 | - |
| NAA | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| BAP | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| GA | - | - | - | - | - | 5 | 5 |

Lampiran 2. Hasil Analisis GC-MS untuk rimpang, kladus dan planlet temu giring

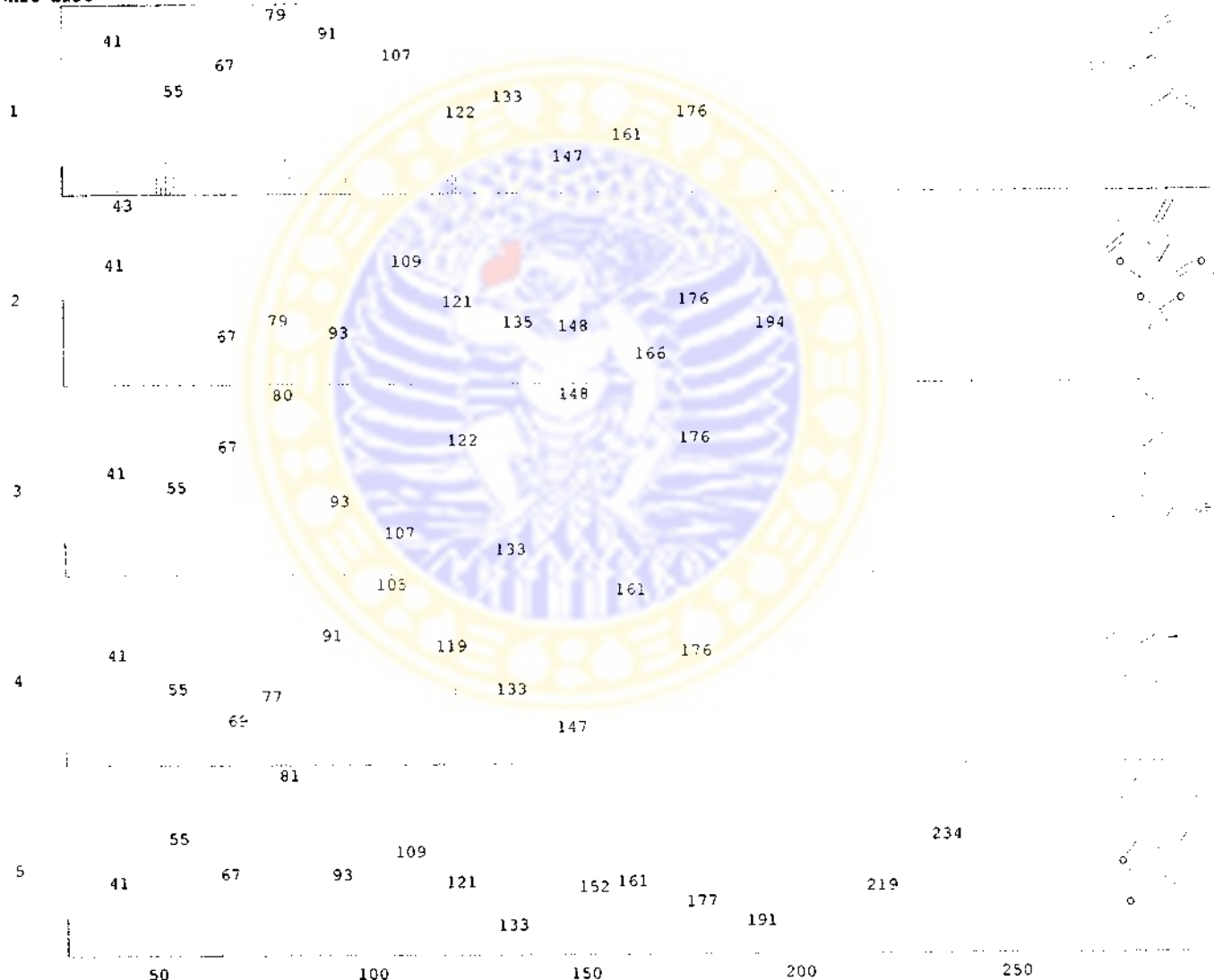


<Unknown Spectrum>

Data : ENDANG1.D01
 Mass Peak # : 110 Ret. Time : 17.558
 Scan # : 1868 B.G. Scan # : 1941
 Base Peak : 42.95 (6245939)

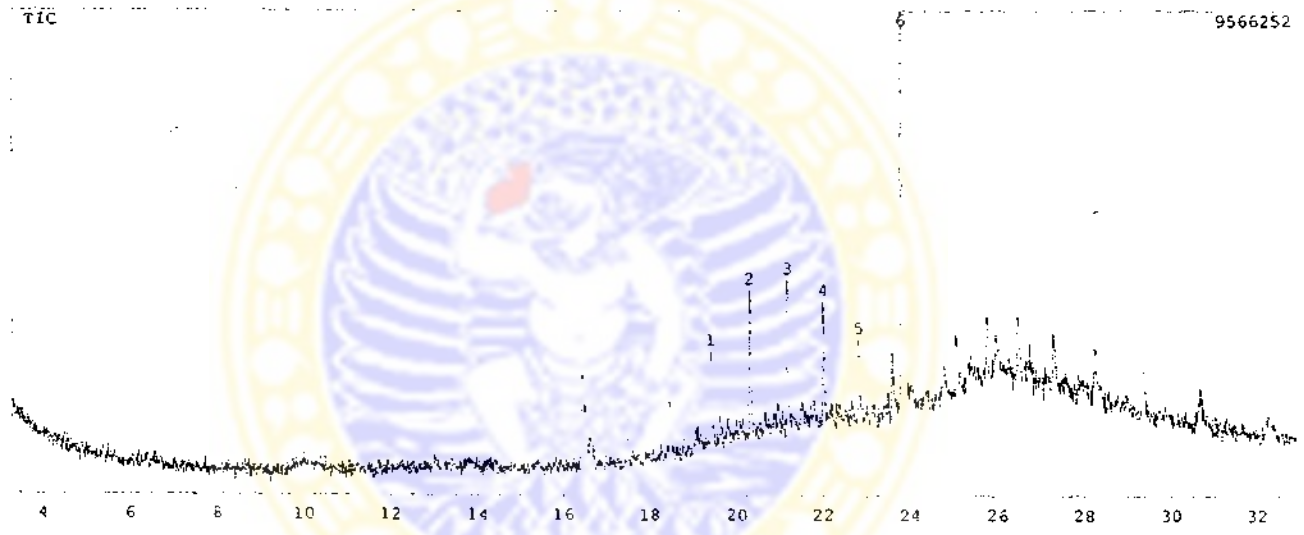
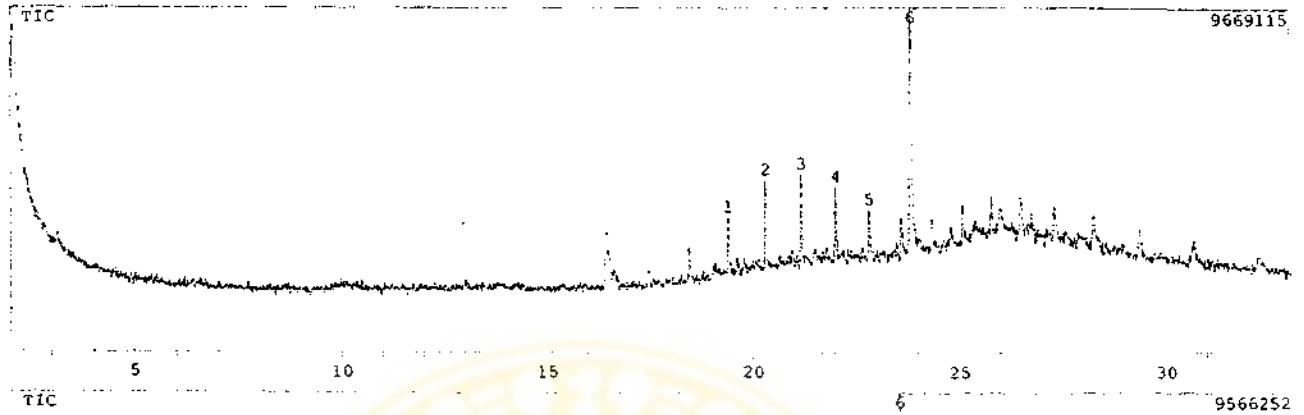


<Hit List>



| No | SI | Mol.Wgt. | Mol.Form./Compound Name | CAS No. | Entry | LIB# |
|----|----|----------|--|------------|-------|------|
| 1 | 73 | 176 | C ₁₃ H ₂₀ Cyclohexane, 1,2-diethenyl-4-(1-methylethylidene)-, cis- | 34528-95-5 | 16807 | 1 |
| 2 | 71 | 252 | C ₁₄ H ₂₀ O ₄ 1,3-Dioxane-4,6-dione, 2,2-dimethyl-5,5-bis(2-methyl-2-propenyl)- | 74793-71-8 | 34303 | 1 |
| 3 | 69 | 194 | C ₁₃ H ₂₂ O Bicyclo 2.2.1 heptan-2-ol, 7-cyclohexyl-, (exo,syn)- | 38935-74-9 | 21388 | 1 |
| 4 | 67 | 194 | C ₁₃ H ₂₂ O 3-Buten-2-ol, 4-(2,6,6-trimethyl-1-cyclohexen-1-yl)- | 22029-76-1 | 21387 | 1 |
| 5 | 67 | 234 | C ₁₅ H ₂₂ O ₂ Cyclodeca b furan-2(3H)-one, 3a,4,5,8,9,11a-hexahydro-3,6,10-trimethyl-, 3S-(3R@,3aR | 2225-79-8 | 30734 | 1 |

Data : ENDANG.D01 02/07/25 17:01:53
 Sample : KALUS TEMU GIRING, ENDANG
 Operator : POY
 Method File Name : ENDANG.MET



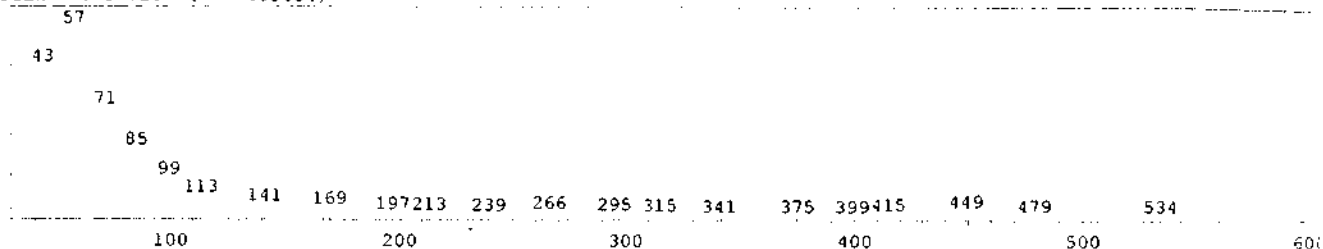
Data : ENDANG.D01 02/07/25 17:01:53
 Sample : KALUS TEMU GIRING, ENDANG
 Operator : POY
 Method File Name : ENDANG.MET

**** Peak Report ****

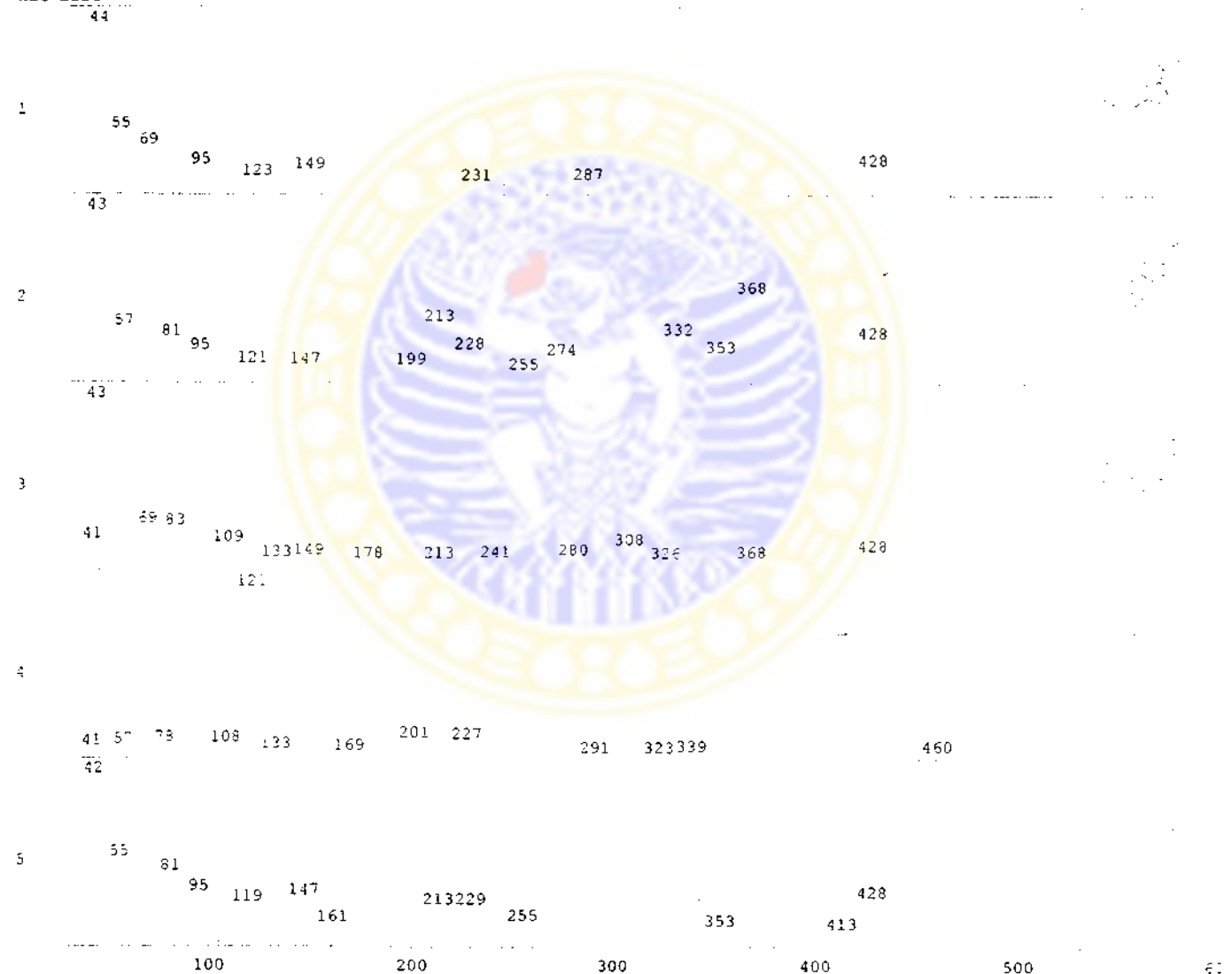
| PKNO | R.Time | I.Time | F.Time | Area | Height | A/H(sec) | MK | %Total | Name |
|-------|--------|--------|--------|----------|---------|----------|----|--------|------|
| 1 | 19.415 | 19.383 | 19.492 | 4344110 | 1605902 | 2.705 | | 6.72 | |
| 2 | 20.314 | 19.492 | 20.392 | 12684023 | 2509327 | 5.055 | | 19.62 | |
| 3 | 21.189 | 20.392 | 21.242 | 11444984 | 2523838 | 4.535 | V | 17.71 | |
| 4 | 22.021 | 21.242 | 22.067 | 8867079 | 2018507 | 4.393 | V | 13.72 | |
| 5 | 22.832 | 22.067 | 22.883 | 2893608 | 1229348 | 2.354 | V | 4.48 | |
| 6 | 23.834 | 23.783 | 23.950 | 24398349 | 6587092 | 3.704 | | 37.75 | |
| Total | | | | 64632354 | | | | 100.00 | |

<Unknown Spectrum>

Data : ENDANG.D01
 Mass Peak # : 124 Ret. Time : 20.317
 Scan # : 2199 B.G. Scan # : 2240
 Base Peak : 57.10 (403654)



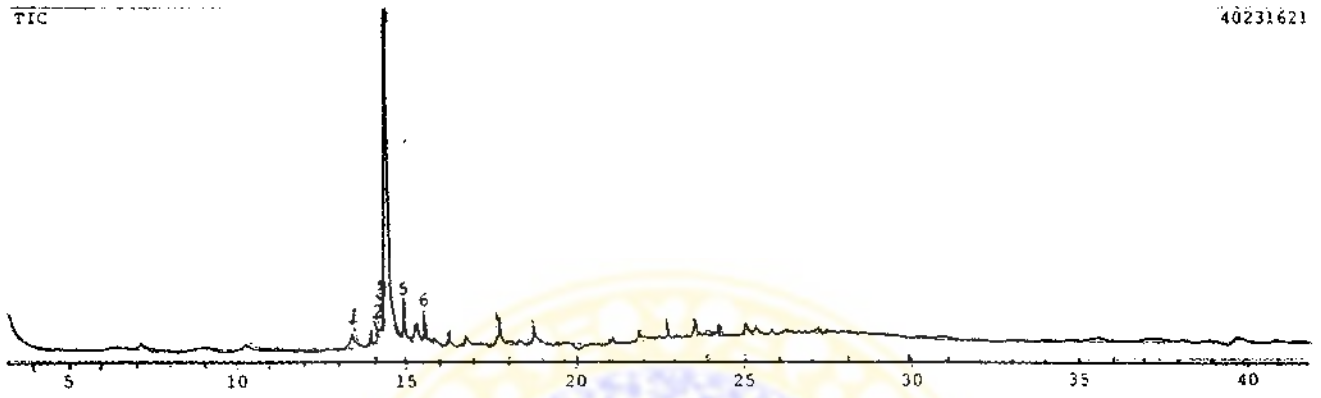
<Hit List>



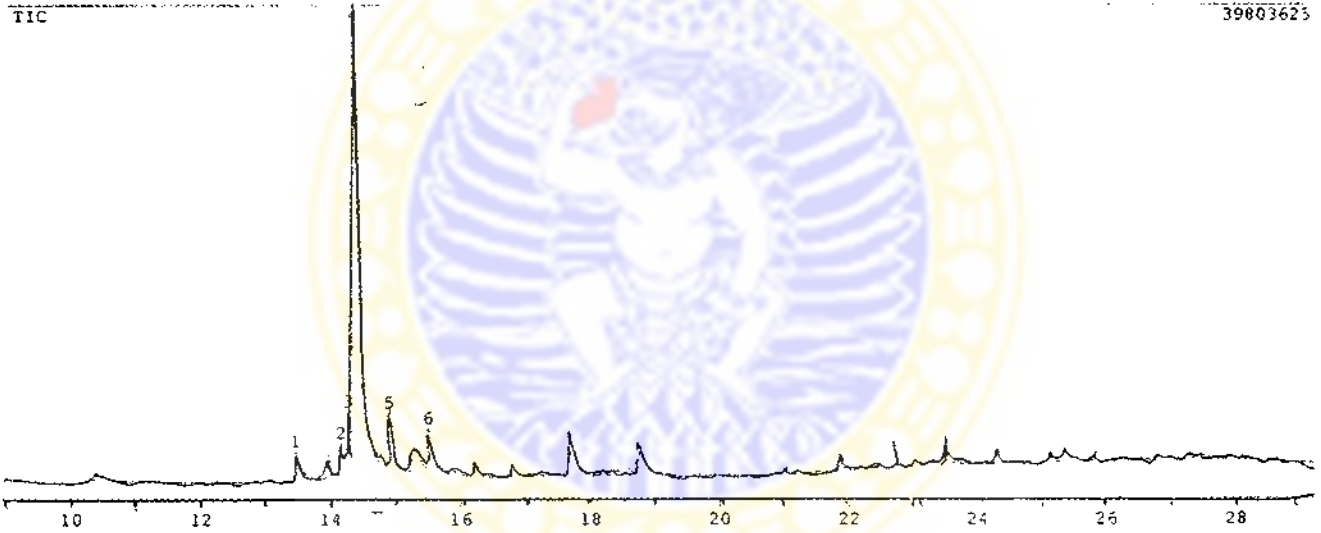
| No | SI | Mol. Wgt. | Mol. Form./Compound Name | CAS No. | Entry | LIB# |
|----|----|-----------|---|------------|-------|------|
| 1 | 60 | 428 | C ₂₉ H ₄₈ O ₂ Stigmastane-3,6-dione, (5.alpha.)- | 22149-69-5 | 55825 | 1 |
| 2 | 47 | 446 | C ₂₉ H ₅₀ O ₃ 3.beta. Acetoxy-5.alpha. hydroxycholestane | - -0 | 56905 | 1 |
| 3 | 46 | 548 | C ₂₈ H ₃₆ O ₁₁ 5H-Cyclopropa 3,4 benz 1,2-e azulen-5-one, 2,9,9a-tris(acetyloxy)-3- | 77573-17-2 | 60039 | 1 |
| 4 | 41 | 460 | C ₂₄ H ₃₂ N ₂ O ₇ Pentamethylphenyramidol glucuronide | - -0 | 57519 | 1 |
| 5 | 38 | 428 | C ₂₉ H ₄₈ O ₂ Cholest-8-en-3.beta.-ol, acetate | 17137-74-5 | 55828 | 1 |

File Name : ENDANG.D02 02/11/01 09:51:19
Sample : TEMU GIRING ~~Plantlet~~ ENDANG
Operator : POY
Method File Name : ENDANG1.MET

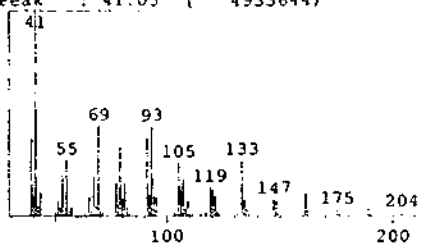
40231621



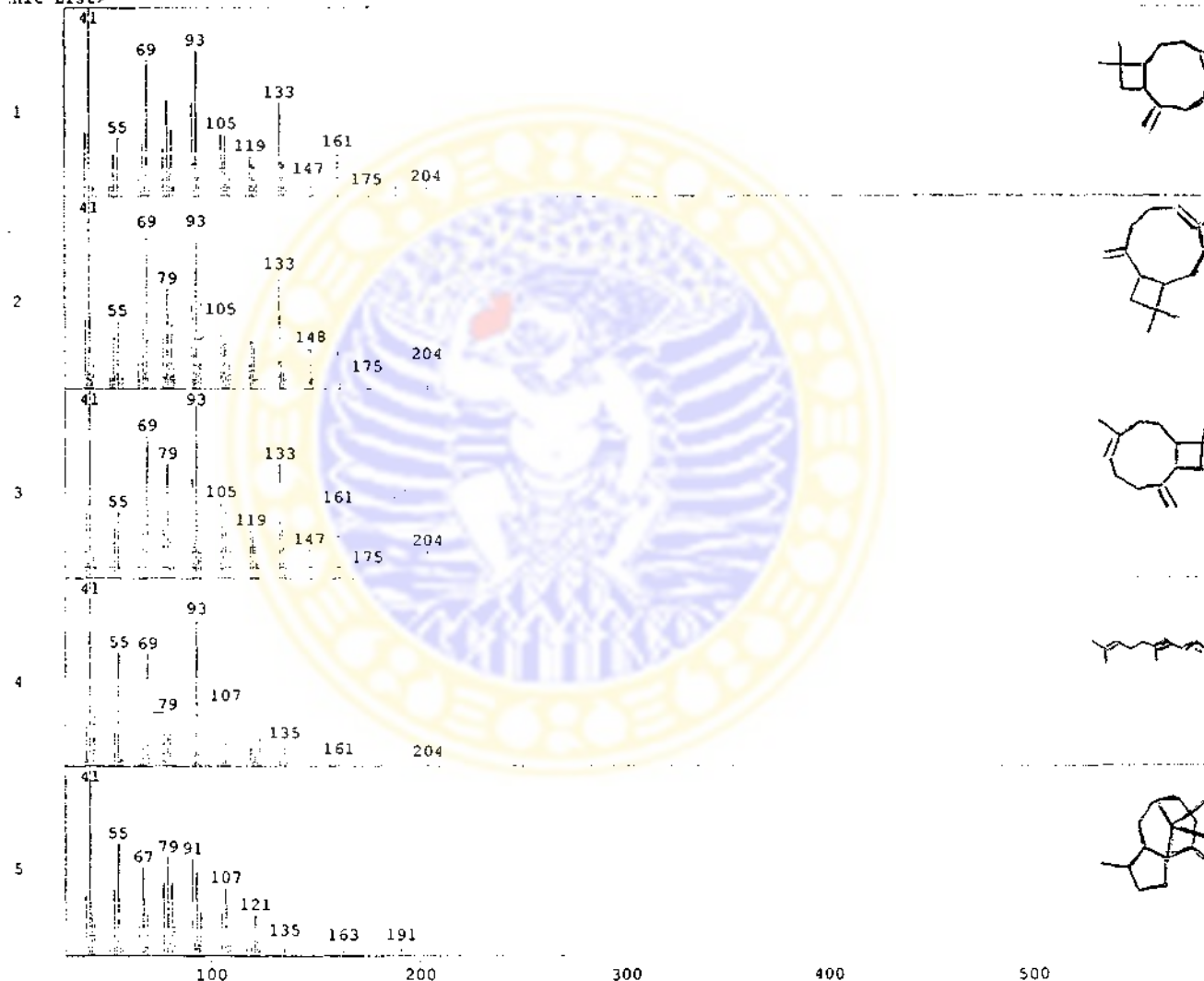
39803625



Unknown Spectrum
 Data : ENDANG.D02
 Mass Peak # : 65 Ret. Time : 14.367
 Scan # : 1365 B.G. Scan # : 1414
 Base Peak : 41.05 (4933644)



Hit List



| No | SI | Mol. Wgt. | Mol. Form./Compound Name | CAS No. | Entry | LIB# |
|----|----|-----------|---|------------|-------|------|
| 1 | 89 | 204 | C ₁₅ H ₂₄ Isocaryophyllene | - -0 | 23887 | 1 |
| 2 | 87 | 204 | C ₁₅ H ₂₄ Caryophyllene \$\$ Bicyclo 7.2.0 undec-4-ene, 4,11,11-trimethyl-8-methylene-, 1R-(1R@, | 87-44-5 | 23949 | 1 |
| 3 | 85 | 204 | C ₁₅ H ₂₄ Bicyclo 7.2.0 undec-4-ene, 4,11,11-trimethyl-8-methylene-, 1R-(1R@,4Z,9S@) - | 118-65-0 | 23940 | 1 |
| 4 | 84 | 204 | C ₁₅ H ₂₄ .alpha.-Farnesene \$\$ 1,3,6,10-Dodecatetraene, 3,7,11-trimethyl- | 502-61-4 | 23923 | 1 |
| 5 | 83 | 206 | C ₁₅ H ₂₆ 1H-3a,7-Methanoazulene, octahydro-1,4,9,9-tetramethyl- | 19078-35-4 | 24464 | 1 |

Library Name
 (1) NIST62.LIB

SPSS for MS WINDOWS Release 6.0

| |
|-------------------------|
| Peneliti: Endang K. A.M |
|-------------------------|

----- O N E W A Y -----

Variable BBK Berat basah kalus umur 6 minggu.
By Variable MEDIUM Perlakuan medium: 1 = A; 2 = B; 3 = C.

Analysis of Variance

| Source | D.F. | Sum of Squares | Mean Squares | F Ratio | F Prob. |
|----------------|------|----------------|--------------|---------|---------|
| Between Groups | 2 | 99365.0417 | 49682.5208 | 2.1493 | .1726 |
| Within Groups | 9 | 208045.4675 | 23116.1631 | | |
| Total | 11 | 307410.5092 | | | |

Multiple Range Tests: LSD test with significance level .05
- No two groups are significantly different at the .050 level

Homogeneous Subsets (highest and lowest means are not significantly different)

Subset 1

| Group | Grp 3 | Grp 2 | Grp 1 |
|-------|----------|----------|----------|
| Mean | 262.9250 | 387.3000 | 485.3000 |

Descriptive Statistics

| Group | Count | Mean | Standard Deviation | Standard Error | 95 Pct Conf Int for Mean |
|-------|-------|----------|--------------------|----------------|--------------------------|
| Grp 1 | 4 | 485.3000 | 157.0083 | 78.5042 | 235.4683 TO 735.1317 |
| Grp 2 | 4 | 387.3000 | 202.8551 | 101.4275 | 64.5170 TO 710.0830 |
| Grp 3 | 4 | 262.9250 | 59.5541 | 29.7770 | 168.1625 TO 357.6875 |
| Total | 12 | 378.5083 | 167.1718 | 48.2583 | 272.2925 TO 484.7242 |

| GROUP | MINIMUM | MAXIMUM |
|-------|----------|----------|
| Grp 1 | 369.0000 | 703.5000 |
| Grp 2 | 128.6000 | 624.2000 |
| Grp 3 | 185.2000 | 320.0000 |
| TOTAL | 128.6000 | 703.5000 |

Levene Test for Homogeneity of Variances

| Statistic | df1 | df2 | 2-tail Sig. |
|-----------|-----|-----|-------------|
| .8951 | 2 | 9 | .442 |

SPSS for MS WINDOWS Release 6.0**Peneliti: Endang K. A.M****----- ONEWAY -----**

Variable TBB Pertambahan berat basah kalus umur 1 bulan.
 By Variable MEDIUM Perlakuan medium: 1 = D; 2 = A; 3 = E.

ANALYSIS OF VARIANCE

| Source | D.F. | Sum of Squares | Mean Squares | F Ratio | F Prob. |
|----------------|------|----------------|--------------|---------|---------|
| Between Groups | 2 | 225861.9004 | 112930.9502 | .4229 | .6579 |
| Within Groups | 42 | 11215024.20 | 267024.3858 | | |
| Total | 44 | 11440886.10 | | | |

Multiple Range Tests: LSD test with significance level .05

- No two groups are significantly different at the .050 level

Homogeneous Subsets (highest and lowest means are not significantly different)

Subset 1

| Group | Grp 1 | Grp 2 | Grp 3 |
|-------|----------|----------|----------|
| Mean | 344.2133 | 368.3467 | 505.1067 |

Descriptive Statistics

| Group | Count | Mean | Standard Deviation | Standard Error | 95 Pct Conf Int for Mean | | |
|-------|-------|----------|--------------------|----------------|--------------------------|----|----------|
| Grp 1 | 15 | 344.2133 | 392.1644 | 101.2564 | 127.0399 | TO | 561.3867 |
| Grp 2 | 15 | 368.3467 | 420.9850 | 108.6979 | 135.2129 | TO | 601.4804 |
| Grp 3 | 15 | 505.1067 | 685.6033 | 177.0220 | 125.4322 | TO | 884.7811 |
| Total | 45 | 405.8889 | 509.9217 | 76.0146 | 252.6914 | TO | 559.0863 |

| GROUP | MINIMUM | MAXIMUM |
|-------|----------|-----------|
| Grp 1 | -64.5000 | 1390.3000 |
| Grp 2 | -48.7000 | 1288.8000 |
| Grp 3 | 6.0000 | 2762.8000 |
| TOTAL | -64.5000 | 2762.8000 |

Levene Test for Homogeneity of Variances

| Statistic | df1 | df2 | 2-tail Sig. |
|-----------|-----|-----|-------------|
| .4567 | 2 | 42 | .636 |

SPSS for MS WINDOWS Release 6.0

| |
|--------------------------------|
| Peneliti: Endang K. A.M |
|--------------------------------|

| | N | Mean | Std Dev | Minimum | Maximum |
|--------|-----|-------|---------|---------|---------|
| MEDIUM | 488 | 1.973 | 0.821 | 1 | 3 |

----- Chi-Square Test

P = Jumlah Parenkim

MEDIUM Medium

| Cases | | | | |
|------------|----------|----------|--------------|----------|
| | Category | Observed | Expected | Residual |
| D | 1 | 171 | 162.67 | 8.33 |
| A | 2 | 159 | 162.67 | -3.67 |
| E | 3 | 158 | 162.67 | -4.67 |
| | | --- | | |
| Total | | 488 | | |
| Chi-Square | | D.F. | Significance | |
| 0.6434 | | 2 | 0.7249 | |

| | N | Mean | Std Dev | Minimum | Maximum |
|--------|----|-------|---------|---------|---------|
| MEDIUM | 60 | 2.200 | 0.632 | 1 | 3 |

----- Chi-Square Test

A = Jumlah Amilum

MEDIUM Macam medium

| Cases | | | | |
|------------|----------|----------|--------------|----------|
| | Category | Observed | Expected | Residual |
| D | 1 | 7 | 20.00 | -13.00 |
| A | 2 | 34 | 20.00 | 14.00 |
| E | 3 | 19 | 20.00 | -1.00 |
| | | -- | | |
| Total | | 60 | | |
| Chi-Square | | D.F. | Significance | |
| 18.3000 | | 2 | 0.0001 | |

| | N | Mean | Std Dev | Minimum | Maximum |
|--------|----|-------|---------|---------|---------|
| MEDIUM | 72 | 2.264 | .731 | 1 | 3 |

----- **Chi-Square Test**

MA = Jumlah minyak atsiri

MEDIUM Macam medium

| | Cases | | |
|-------|----------|----------|-------------------|
| | Category | Observed | Expected Residual |
| D | 1 | 12 | 24.00 -12.00 |
| A | 2 | 29 | 24.00 5.00 |
| E | 3 | 31 | 24.00 7.00 |
| | -- | | |
| Total | | 72 | |

| Chi-Square | D.F. | Significance |
|------------|------|--------------|
| 9.0833 | 2 | 0.0107 |

| | N | Mean | Std Dev | Minimum | Maximum |
|--------|----|-------|---------|---------|---------|
| MEDIUM | 78 | 1.577 | 0.782 | 1 | 3 |

----- **Chi-Square Test**

T = Jumlah trakea

MEDIUM Macam medium

| | Cases | | |
|-------|----------|----------|-------------------|
| | Category | Observed | Expected Residual |
| D | 1 | 47 | 26.00 21.00 |
| A | 2 | 17 | 26.00 -9.00 |
| E | 3 | 14 | 26.00 -12.00 |
| | -- | | |
| Total | | 78 | |

| Chi-Square | D.F. | Significance |
|------------|------|--------------|
| 25.6154 | 2 | 0.0000 |

| | N | Mean | Std Dev | Minimum | Maximum |
|--------|---|-------|---------|---------|---------|
| MEDIUM | 9 | 2.444 | 0.726 | 1 | 3 |

----- Chi-Square Test

S = Jumlah serabut

MEDIUM Macam medium

| | Cases | | | |
|-------|----------|----------|----------|----------|
| | Category | Observed | Expected | Residual |
| D | 1 | 1 | 3.00 | -2.00 |
| A | 2 | 3 | 3.00 | 0.00 |
| E | 3 | 5 | 3.00 | 2.00 |
| | - | | | |
| Total | | 9 | | |

Warning - Chi-Square statistic is questionable here.
3 cells have expected frequencies less than 5.
Minimum expected cell frequency is 3.0

| Chi-Square | D.F. | Significance |
|------------|------|--------------|
| 2.6667 | 2 | 0.2636 |



P = parenkim

| | O | E | O-E | (O-E) ² | (O-E) ² /E |
|---|-----|--------|-------|--------------------|-----------------------|
| D | 171 | 162.67 | 8.33 | 69.4444 | 0.42691 |
| A | 159 | 162.67 | -3.67 | 13.4444 | 0.08265 |
| E | 158 | 162.67 | -4.67 | 21.7778 | 0.13388 |
| | 488 | | | χ^2 | 0.64344 |

$$\chi^2_{0.05} (2) \quad 5.991$$

A = Amilum

| | O | E | O-E | (O-E) ² | (O-E) ² /E |
|---|----|-------|--------|--------------------|-----------------------|
| D | 7 | 20.00 | -13.00 | 169.0000 | 8.45000 |
| A | 34 | 20.00 | 14.00 | 196.0000 | 9.80000 |
| E | 19 | 20.00 | -1.00 | 1.0000 | 0.05000 |
| | 60 | | | χ^2 | 18.30000 |

$$\chi^2_{0.05} (2) \quad 5.991$$

MA = Minyak Atsiri

| | O | E | O-E | (O-E) ² | (O-E) ² /E |
|---|----|-------|--------|--------------------|-----------------------|
| D | 12 | 24.00 | -12.00 | 144.0000 | 6.00000 |
| A | 29 | 24.00 | 5.00 | 25.0000 | 1.04167 |
| E | 31 | 24.00 | 7.00 | 49.0000 | 2.04167 |
| | 72 | | | χ^2 | 9.08333 |

$$\chi^2_{0.05} (2) \quad 5.991$$

T = Trakea

| | O | E | O-E | (O-E) ² | (O-E) ² /E |
|---|----|-------|--------|--------------------|-----------------------|
| D | 47 | 26.00 | 21.00 | 441.0000 | 16.96154 |
| A | 17 | 26.00 | -9.00 | 81.0000 | 3.11538 |
| E | 14 | 26.00 | -12.00 | 144.0000 | 5.53846 |
| | 78 | | | χ^2 | 25.61538 |

$$\chi^2_{0.05} (2) \quad 5.991$$

S = Serabut

| | O | E | O-E | (O-E) ² | (O-E) ² /E |
|---|---|------|-------|--------------------|-----------------------|
| D | 1 | 3.00 | -2.00 | 4.0000 | 1.33333 |
| A | 3 | 3.00 | 0.00 | 0.0000 | 0.00000 |
| E | 5 | 3.00 | 2.00 | 4.0000 | 1.33333 |
| | 9 | | | χ^2 | 2.66667 |

$$\chi^2_{0.05} (2) \quad 5.991$$