

Pertumbuhan dan Produksi Saponin Kultur Kalus *Talinum paniculatum* Gaertn. pada Variasi Penambahan Asam 2,4-Diklorofenoksi Asetat (2,4-D) dan Kinetin

Growth and saponin production of Talinum paniculatum Gaertn. callus culture on various addition with 2,4-dichloro phenoxy acetic acid (2,4-D) and kinetin

DIAN PRAMITA WARDANI, SOLICHATUN*, AHMAD DWI SETYAWAN

Jurusan Biologi FMIPA Universitas Sebelas Maret Surakarta 57126.

* Korespondensi: Jl. Ir. Sutami 36A Surakarta 57126. Tel. & Fax.: +62-271-663375. e-mail: olich@mipa.uns.ac.id.

Diterima: 17 Agustus 2002. Disetujui: 28 Pebruari 2003.

Abstract. The objectives of the research were to study the effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and kinetin on callus growth and saponin production from *Talinum paniculatum* Gaertn. callus. The research outline was *T. paniculatum* as a medicinal plant potentially to be developed with an *in-vitro* culture method. The addition of 2,4-D and kinetin in the culture's medium would induce protein synthesis. Furthermore, it would influence cell proliferation and cell metabolism with regulation enzyme action so that both induced callus growth and secondary metabolism production from the cell that be cultured. The research used factorial completely randomized design with two factors (2,4-D concentration: 0 mgL⁻¹, 0.5 mgL⁻¹, 1 mgL⁻¹, 1.5 mgL⁻¹ and kinetin concentration: 0 mgL⁻¹, 0.5 mgL⁻¹, 1 mgL⁻¹, 1.5 mgL⁻¹) with three replicates. Data collected were qualitative data (callus morphology included texture and color of callus) and quantitative data (callus growth rate, wet callus weight, dry callus weight, and saponin content). Data were analyzed using ANOVA followed by DMRT 5% confidence level and correlation regression. The result of the research indicated that the treatment with additional plant regulation (2,4-D and kinetin) on MS medium has a significant effect on callus growth and saponin production. Addition 2,4-D 1.5 mgL⁻¹ and kinetin 1.5 mgL⁻¹ as an optimum combination concentration to induce callus growth and saponin production.

Keywords: callus growth, saponin, *Talinum paniculatum* Gaertn., 2,4-D and kinetin.

PENDAHULUAN

Pemanfaatan tumbuhan sebagai bahan baku obat terus meningkat. Sampai saat ini, sebagian besar bahan baku tanaman obat masih dipanen dari alam seiring dengan kembalinya masyarakat memanfaatkan tumbuhan sebagai bahan obat alami (Lestari dan Mariska, 1997). Sintesis senyawa obat secara alami belum mencukupi kebutuhan masyarakat karena produksinya masih sangat rendah. Oleh karena itu dibutuhkan suatu metode untuk meningkatkan kandungan senyawa metabolit sekunder tanaman yang berfungsi sebagai senyawa obat.

Banyak terpenoid dan steroid alkohol yang terdapat di alam bukan sebagai alkohol bebas, tetapi sebagai glikosida misalnya saponin (Robinson, 1995). Saponin banyak digunakan sebagai bahan baku obat tradisional. Saponin ini merupakan salah satu senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam beberapa tanaman obat contohnya *Talinum paniculatum* Gaertn.

T. paniculatum (som jawa) merupakan herba tahunan, tingginya 30-60 cm (Heyne, 1987). Tumbuhan ini termasuk dalam famili *Portulaca-*

ceae dan merupakan tanaman obat yang digunakan sebagai bahan baku obat tradisional atau jamu (Hutapea, 1991). *T. paniculatum* mengandung saponin, flavonoid, tanin, triterpen/sterol, polifenol, dan minyak atsiri (Saroni dkk., 1999). Tumbuhan ini sering digunakan sebagai pengganti ginseng (*Panax ginseng*); ginseng maupun som jawa lebih banyak digunakan sebagai tonik (menguatkan tubuh). Selama ini penggunaan kedua tumbuhan ini terutama banyak digunakan untuk membantu penyembuhan penyakit dan memperkuat daya tahan tubuh. Selain itu, som jawa terutama daun dan akarnya sering digunakan sebagai obat anti radang untuk mengurangi pembengkakan (Sumastuti, 1999). Nilai ekonomi yang lain dari saponin terletak pada penggunaannya sebagai bahan dasar industri hormon seks, kortikosteroid dan turunan steroid (Manitto, 1992). Kandungan saponin tanaman *T. paniculatum* dapat ditingkatkan produksinya, salah satunya dengan menggunakan teknik kultur *in vitro*.

Kultur *in vitro* dapat digunakan sebagai sarana penghasil senyawa metabolit sekunder. Hal ini disebabkan karena metabolit sekunder merupa-

kan hasil dari proses-proses biokimia yang terjadi pada tubuh tanaman secara utuh, sedang proses-proses tersebut juga terjadi pada kultur *in vitro*. Pada kultur *in vitro*, senyawa ini terdapat pada kalus atau bagian lain seperti daun, akar, dan batang (Ignacimuthu, 1997). Produksi metabolit sekunder melalui kultur *in vitro* dipengaruhi oleh berbagai faktor baik genetis maupun kondisi lingkungan kultur.

Adanya perbedaan kondisi lingkungan pertumbuhan antara kultur *in vitro* dan tumbuhan asalnya, memungkinkan suatu kultur jaringan tanaman mempunyai kandungan metabolit sekunder yang berbeda dengan tanaman asal, baik secara kuantitatif maupun kualitatif (Gunawan, 1992). Penggunaan kultur *in vitro* untuk meningkatkan produksi metabolit sekunder terutama senyawa obat, dianggap lebih menguntungkan dibandingkan produksi tanaman utuh, karena dalam kultur *in vitro* pasokan zat hara yang teratur dapat dijamin serta dimungkinkan pula untuk pengaturan proses metabolisme sehingga dapat diperoleh hasil yang sebesar-besarnya (Kurz dan Constabel, 1991).

Sejauh ini penelitian tentang metabolit sekunder som jawa secara *in vitro* belum banyak dilakukan. Dalam penelitian ini, sumber eksplan yang dipakai adalah daun som jawa. Melalui kultur *in vitro* diharapkan kandungan saponin yang terdapat pada som jawa dapat ditingkatkan. Pemberian zat pengatur tumbuh (ZPT) pada sel maupun kalus dapat mempengaruhi produksi senyawa metabolit sekunder tertentu (Toruan dkk., 1990). Menurut Abidin (1982) ZPT dapat mengatur proses-proses fisiologi tanaman karena ZPT mempengaruhi sintesis protein dan mengatur aktivitas enzim. Zat pengatur tumbuh mempengaruhi metabolisme asam nukleat yang berperan dalam sintesis protein dan mengatur aktivitas enzim untuk pertumbuhan tanaman.

Penelitian ini menggunakan ZPT dari jenis auksin berupa 2,4-D dan sitokinin berupa kinetin. Pemberian 2,4-D secara eksogen diharapkan dapat memenuhi kebutuhan hormon auksin dalam eksplan sehingga akan meningkatkan sintesis protein sebagai bahan baku penyusun enzim yang nantinya dapat memacu kerja enzim dalam proses metabolisme tubuh.

Penelitian tentang metabolit sekunder som jawa dengan menggunakan teknik kultur *in vitro* belum banyak dilakukan, oleh karena itu hasil penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai alternatif usaha peningkatan produksi saponin sebagai bahan baku obat dengan cara menginduksi pertumbuhan kalus yang menghasilkan metabolit sekunder berkadar tinggi dibandingkan dengan produksi tanaman utuh.

Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari pengaruh pemberian variasi zat pengatur tumbuh 2,4-D dan kinetin pada berbagai konsentrasi terhadap pertumbuhan dan produksi saponin kalus *T. paniculatum*.

BAHAN DAN METODE

Tempat dan waktu penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Oktober 2002 s.d. Maret 2003. Lokasi penelitian di Sub Lab. Biologi, Laboratorium Pusat MIPA UNS Surakarta.

Bahan tanaman

Daun ketiga dari pucuk tanaman *T. paniculatum* yang diperoleh dari biji yang telah dikecambahkan sampai berumur 1 bulan di rumah kaca.

Cara kerja

Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan dua faktor, yaitu konsentrasi asam 2,4-diklorofenoksiasetat (D) yang terdiri dari 4 taraf dan konsentrasi kinetin (N) yang terdiri dari 4 taraf:

Perlakuan dengan pemberian 2,4-D:

- D₀ perlakuan dengan konsentrasi 0 mg/l sebagai kontrol
- D₁ perlakuan dengan konsentrasi 0,5 mg/l
- D₂ perlakuan dengan konsentrasi 1,0 mg/l
- D₃ perlakuan dengan konsentrasi 1,5 mg/l

Perlakuan dengan pemberian kinetin:

- N₀ perlakuan dengan konsentrasi 0 mg/l
- N₁ perlakuan dengan konsentrasi 0,5 mg/l
- N₂ perlakuan dengan konsentrasi 1,0 mg/l
- N₃ perlakuan dengan konsentrasi 1,5 mg/l

Setiap kombinasi perlakuan dengan 3 ulangan.

Tabel 1. Variasi konsentrasi perlakuan.

N/D	N ₀	N ₁	N ₂	N ₃
D ₀	D ₀ N ₀	D ₀ N ₁	D ₀ N ₂	D ₀ N ₃
D ₁	D ₁ N ₀	D ₁ N ₁	D ₁ N ₂	D ₁ N ₃
D ₂	D ₂ N ₀	D ₂ N ₁	D ₂ N ₂	D ₂ N ₃
D ₃	D ₃ N ₀	D ₃ N ₁	D ₃ N ₂	D ₃ N ₃

Persiapan penelitian

Sterilisasi alat. Botol kultur, skapel, gunting, cawan petri dicuci dengan deterjen lalu dikeringkan. Setelah kering, alat-alat yang akan digunakan untuk penanaman dibungkus dengan kertas, sedangkan botol kultur ditutup dengan alumunium foil, kemudian alat-alat tersebut disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 30 menit.

Pembuatan media. Komposisi yang digunakan adalah media dasar MS, baik hara makro dan mikro ditambah dengan vitamin, gula dan agar kemudian ditambah dengan akuades hingga volume 1000 ml. Keasaman media diatur pada pH 5,6-5,8 dengan ditambahkan NaOH 1 N jika terlalu asam atau HCl 1 N jika terlalu basa. Setelah pH stabil, larutan media dimasak sampai mendidih dan dituang ke dalam botol kultur yang telah steril. Media disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 28 menit (Hendaryono dan Wijayani, 1994).

Media induksi kalus. Media yang digunakan untuk induksi kalus adalah media MS ditambah dengan 2,4-D 0,5 mg/l dan kinetin 0,5 mg/l.

Media perlakuan. Media perlakuan adalah media dengan komposisi sama dengan media induksi kalus. Dalam media perlakuan juga ditambah lagi 2,4-D, dan kinetin sesuai taraf konsentrasi yang digunakan.

Pelaksanaan penelitian

Uji busa. Merupakan percobaan awal untuk mengetahui ada tidaknya saponin dalam daun som jawa. Daun som jawa digerus dengan mortal kemudian dilarutkan dalam akuades sambil dikocok kuat-kuat selama 1 menit. Saponin (+) ditunjukkan dengan adanya busa yang stabil selama 30 menit (Harborne, 1996).

Induksi kalus. Tahap ini bertujuan untuk menghasilkan kalus dengan media induksi kalus. Sterilisasi bahan tanaman yang diambil dari lapangan dimulai dengan pencucian dan pembuangan bagian yang kotor dengan air mengalir, daun sebagai sumber eksplan dicuci lalu direndam dengan deterjen sambil dikocok-kocok sekitar 5 menit, kemudian dibilas dengan air mengalir. Setelah itu daun direndam dalam alkohol 70% selama 5 menit, kemudian direndam dalam akuades steril selama 5 menit. Setelah itu direndam dalam klorok 20% selama 10 menit lalu dimasukkan dalam akuades steril selama 10 menit dan terakhir dicuci beberapa kali dengan akuades steril (Jokopriyambodo dkk., 1999).

Setelah sterilisasi dilanjutkan dengan penanaman eksplan dalam media. Penanaman dilakukan dalam *laminar air flow cabinet* (LAF), eksplan yang sudah steril dipotong kecil pada bagian tengah daun meliputi tulang dan daging daun dengan ukuran (1x1) cm, diambil dengan pinset steril, lalu ditanam dalam botol kultur berisi media MS, kemudian botol ditutup dengan *aluminium foil*, setelah itu ditutup lagi dengan plastik *clean wrap*. Botol kultur yang sudah berisi eksplan disimpan dalam rak kultur di ruang kultur dan dijaga cahaya, suhu dan kelembabannya. Untuk menghindari kontaminasi, setiap 2 hari sekali botol kultur dan rak kultur disemprot alkohol 70%.

Perlakuan pemberian ZPT. Kalus yang dihasilkan dari media induksi pada percobaan induksi kalus diperbanyak (disubkulturkan) setelah kalus berumur 4 minggu. Empat minggu setelah dilakukan subkultur, kalus yang dihasilkan ditanam dalam media perlakuan. Pengamatan dilakukan pada saat kalus berumur 4 minggu setelah perlakuan.

Pengamatan

Pengamatan kalus. Pengamatan kalus meliputi warna dan koloni sel-sel kalus.

Pengukuran parameter pengamatan. Berat basah kalus diukur dengan cara penimbang kalus awal (WWo) dan kalus akhir (WWt). Laju pertum-

bahan kalus diperoleh dengan menggunakan hasil dari pengukuran berat basah kalus awal dan berat basah kalus akhir dengan rumus (Sitompul dan Guritno, 1995):

$$LPk = \frac{WW_t - WW_o}{t}$$

Berat kering kalus diukur dengan penimbangan kalus yang telah dikeringkan dalam oven bertemperatur $\pm 70^\circ\text{C}$ hingga beratnya konstan.

Analisis kadar saponin pada kalus. Kalus kering digerus dengan mortal hingga menjadi serbuk halus. Serbuk ini dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan diekstraksi dengan etanol 70% di atas penangas air pada suhu 80°C selama 15 menit (Stahl, 1985). Hasil ekstraksi diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada $\lambda = 365 \text{ nm}$ dengan menggunakan saponin Merck sebagai larutan pembanding (Stahl, 1985).

Penghitungan kadar saponin. Absorbansi yang telah diperoleh dari analisis kandungan saponin secara spektrofotometer dikonversi ke dalam molaritas (M atau mol/l) dengan menggunakan persamaan rumus Lambert-Beer, $A = \varepsilon BC$, dengan A = absorbansi, ε = koefisien ekstingsi molar ($1 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), B = tebal larutan (1 cm), dan C = konsentrasi larutan (M atau mol/l) (Roth dan Blaschke, 1985). Adapun langkah-langkahnya sebagai berikut: larutan standar saponin Merck yang akan digunakan diukur absorbansinya terlebih dahulu. Koefisien ekstingsi molar (ε) dihitung menggunakan rumus Lambert-Beer. Absorbansi yang telah diperoleh dari larutan sampel dihitung konsentrasinya dengan menggunakan rumus Lambert-Beer yang telah diketahui koefisien ekstingsinya tersebut.

Analisis data

Analisis yang digunakan adalah analisis kualitatif dan kuantitatif. Analisis kualitatif meliputi warna dan tekstur kalus, sedangkan analisis kuantitatif meliputi laju pertumbuhan kalus, berat basah kalus, berat kering kalus, dan kadar saponin pada setiap perlakuan. Data ini kemudian dianalisis sidik ragam dengan menggunakan uji ANAVA dan dilanjutkan dengan uji DMRT taraf 5%. Untuk mengetahui hubungan antar variabel yang diteliti dilanjutkan analisis dengan menggunakan uji regresi korelasi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Morfologi kalus

Morfologi kalus pada media inisiasi

Kalus adalah proliferasi masa jaringan yang belum terdiferensiasi. Masa sel ini terbentuk di seluruh permukaan irisan eksplan sehingga semakin luas permukaan irisan eksplan semakin cepat dan semakin banyak kalus yang terbentuk (Hendaryono dan Wijayani, 1994). Senyawa 2,4-

D merupakan salah satu jenis auksin yang sangat efektif untuk menginduksi pembentukan kalus, walaupun auksin yang berperan utama tetapi sitokinin sangat dibutuhkan untuk proliferasi kalus sehingga kombinasi auksin dan sitokinin sangat baik untuk memacu pertumbuhan kalus (Abidin, 1982).

Penggunaan kombinasi zat pengatur tumbuh, 2,4-D dan kinetin dengan konsentrasi 0,5 mg/l mampu menginduksi terbentuknya kalus som jawa yang berasal dari potongan daun secara *in vitro*. Pada umur 7-10 hari setelah dikulturkan mulai terlihat inisiasi kalus di sepanjang irisan daun untuk semua kombinasi perlakuan yang diujikan. Penambahan 2,4-D dan kinetin dengan konsentrasi yang seimbang ternyata mampu merangsang sel daun untuk melakukan proses dediferensiasi membentuk kalus.

Penampakan kalus pada semua perlakuan pada awalnya berwarna putih remah (*friable*), kemudian pada awal pertengahan minggu ketiga kalus yang terbentuk semakin banyak dan warnanya berubah menjadi coklat muda dengan struktur kompak. Pada akhir minggu ketujuh kalus mulai berubah warna menjadi coklat tua dan akhirnya kehitaman. Hal ini disebabkan senyawa fenol di jaringan mulai terbentuk, sehingga kalus harus segera disubkultur.

Morfologi kalus pada media perlakuan

Kalus pada media perlakuan mengalami pertambahan volume karena terjadi pembesaran sel. Pada umumnya ukuran kalus menjadi dua kali ukuran semula, yang ditunjukkan dengan peningkatan berat basah kalus akhir menjadi dua kali berat basah kalus awal. Pemberian kombinasi zat pengatur tumbuh antara auksin dan sitokinin dimaksudkan untuk merangsang pembesaran, proliferasi sel dan pertumbuhan kalus dari eksplan yang ditanam.

Kalus pada media perlakuan mempunyai susunan sel yang kompak, rapat, padat, dan sulit dipisah-pisahkan. Pada permukaan bawah eksplan yang tumbuh menjadi kalus terlihat kondisi jaringan yang berair. Kondisi ini disebabkan bagian jaringan yang ada di permukaan bawah langsung bersentuhan dengan media dan berperan sebagai area penyerapan media.

Warna kalus pada awal perlakuan semula berwarna coklat sampai coklat kehitaman kemudian pada awal minggu pertama terbentuk kalus baru yang berwarna kuning bening kemudian warna kalus ini akan berubah menjadi kecoklatan seiring dengan pertumbuhan kalus yang semakin tua. Kondisi warna kalus yang bervariasi menurut Hendaryono dan Wijayani (1994) disebabkan oleh adanya pigmentasi, pengaruh cahaya, dan bagian tanaman yang dijadikan sebagai sumber eksplan. Eksplan yang cenderung berwarna kecoklatan disebabkan oleh kondisi eksplan yang secara internal mempunyai kandungan fenol tinggi. Fenol akan teroksidasi menjadi kuinon fenolik oleh pengaruh cahaya.

Kalus pada perlakuan 1,5 mg/l 2,4-D dan 1,5 mg/l kinetin (D_3N_3) mempunyai warna hijau kekuningan. Hal ini disebabkan karena 2,4-D efektif untuk memacu pembentukan kalus karena aktivitasnya yang kuat untuk memacu proses dediferensiasi sel, menekan organogenesis serta memacu pertumbuhan kalus (Lestari dan Mariska, 1997). Warna kalus yang hijau disebabkan peningkatan konsentrasi sitokinin yang tinggi. Sitokinin yang ditambahkan dalam media mampu menghambat perombakan butir-butir klorofil karena sitokinin mampu mengaktifkan proses metabolisme dan sintesis protein (Wattimena, 1991). Hal ini ditunjukkan dengan data yang diperoleh pada perlakuan dengan pemberian sitokinin yang tinggi didapatkan warna kalus yang berwarna hijau (Tabel 2).

Tabel 2. Tekstur dan warna kalus *T. paniculatum* pada media perlakuan.

No	Warna		Tekstur	
	Awal	Akhir	Awal	Akhir
1.	Coklat tua	Kuning bening, coklat sedang	Kompak	Kompak, berair
2.	Coklat tua	Kuning bening, coklat tua kehitaman	Kompak	Kompak, berair
3.	Coklat tua	Kuning bening, coklat tua kehitaman	Kompak	Kompak, berair
4.	Coklat sedang	Kuning bening, coklat sedang	Kompak	Kompak, berair
5.	Coklat tua	Kuning bening, coklat sedang kehitaman	Kompak	Kompak, berair
6.	Coklat sedang	Kuning bening, coklat sedang	Kompak	Kompak, berair
7.	Coklat sedang	Kuning bening, hijau kekuningan, coklat muda	Kompak	Kompak, berair
8.	Coklat sedang	Kuning bening, coklat sedang	Kompak	Kompak, berair
9.	Coklat sedang	Kuning bening, coklat sedang	Kompak	Kompak, berair
10.	Coklat tua	Kuning bening, coklat sedang	Kompak	Kompak, berair
11.	Coklat tua	Coklat sedang	Kompak	Kompak, berair
12.	Coklat sedang	Kuning bening, hijau kekuningan, coklat muda	Kompak	Kompak, berair
13.	Coklat tua	Kuning bening, coklat tua	Kompak	Kompak, berair
14.	Coklat tua	Kuning bening, coklat sedang	Kompak	Kompak, berair
15.	Coklat sedang	Kuning bening, coklat muda	Kompak	Kompak, berair
16.	Coklat tua	Kuning bening, hijau kekuningan, coklat tua kehitaman	Kompak	Kompak, berair

Keterangan: Penambahan 2,4-D: D0: 0 mg/l; D1: 0,5 mg/l; D2: 1 mg/l; D3: 1,5 mg/l. Penambahan kinetin: N0: 0 mg/l; N1: 0,5 mg/l; N2: 1 mg/l; N3: 1,5 mg/l.

Tabel 3. Laju pertumbuhan kalus *T. paniculatum* (mg/hr).

Penambahan 2,4-D	Penambahan Kinetin				Rerata
	0 mg/l	0,5 mg/l	1 mg/l	1,5 mg/l	
0 mg/l	12,30 ^{de}	9,90 ^e	21,80 ^{cde}	37,20 ^{bcde}	2,03 ^C
0,5 mg/l	30,70 ^{bcde}	31,80 ^{bcde}	27,90 ^{bcde}	40,20 ^{bcde}	3,27 ^C
1 mg/l	46,50 ^{bcde}	49,60 ^{bcd}	50,90 ^{bc}	51,30 ^{bc}	4,96 ^B
1,5 mg/l	60,00 ^b	52,10 ^{bc}	64,80 ^{ab}	96,40 ^a	6,83 ^A
Rerata	3,74 ^B	3,59 ^B	4,14 ^{AB}	5,63 ^A	

Keterangan: angka-angka dalam kolom dan baris yang sama tidak berbeda nyata dalam DMRT pada taraf uji 5% jika dibelakangnya terdapat huruf yang sama.

Laju pertumbuhan kalus

Data yang diperoleh menunjukkan bahwa perlakuan untuk setiap tingkat kombinasi konsentrasi antara 2,4-D dan kinetin yang diuji memberikan laju pertumbuhan kalus yang berbeda nyata (Tabel 3). Semakin tinggi kombinasi konsentrasi zat pengatur tumbuh yang ditambahkan dalam medium menyebabkan laju pertumbuhan kalus semakin tinggi yang ditunjukkan oleh peningkatan berat basah kalus akhir. Laju pertumbuhan kalus tertinggi (96,40 mg/hr) diperoleh dari perlakuan kombinasi 1,5 mg/l 2,4-D dan 1,5 mg/l kinetin pada masa inkubasi 5 minggu.

Pada awal masa inkubasi, laju pertumbuhan kalus tidak mengalami peningkatan yang berarti kemudian mencapai optimum pada masa inkubasi 4-5 minggu. Laju pertumbuhan kalus dapat ditingkatkan dengan jalan mengatur komposisi media tumbuh yang digunakan, salah satunya dengan penambahan zat pengatur tumbuh. Penggunaan auksin 2,4-D dapat memacu pertumbuhan kalus, sedangkan penambahan sitokinin dalam media sangat dibutuhkan untuk meningkatkan pembelahan sel, karena sitokinin berperan dalam pembentukan benang gelendong pada tahap metafase (Gunawan dkk., 1992) sehingga pemberian kombinasi antara auksin dan sitokinin dapat memberikan hasil yang lebih baik untuk meningkatkan laju pertumbuhan kalus.

Penambahan 2,4-D dalam media ternyata efektif untuk meningkatkan laju pertumbuhan kalus. Semakin tinggi konsentrasi 2,4-D yang ditambahkan semakin meningkatkan laju pertumbuhan kalus. Auksin berupa 2,4-D dapat menaikkan tekanan osmotik, meningkatkan permeabilitas sel terhadap air, menyebabkan pengurangan tekanan pada dinding sel, meningkatkan sintesis protein, meningkatkan plastisitas dan pengembangan dinding sel (Abidin, 1982). Plastisitas dan pengembangan dinding sel didorong oleh pemberian auksin, karena auksin mengeluarkan H^+ ke dalam dinding sel dan H^+ ini menyebabkan pH dinding sel menurun sehingga terjadi pelonggaran struktur dinding (berarti peningkatan plastisitas) dan terjadi pertumbuhan. Menurut Lakitan (1996)

pelonggaran dinding sel terjadi karena pH yang rendah mengaktifkan enzim yang mematahkan ikatan-ikatan antara polisakarida pembatas pada dinding sel kemudian sel akan tumbuh lebih cepat karena adanya kenaikan tekanan turgor.

Pertumbuhan juga membutuhkan pembentukan senyawa bahan baku dinding sel. Pembuatan komponen-komponen dinding sel dan penyusunan kembali ke dalam suatu matriks dinding sel yang utuh juga dipengaruhi oleh 2,4-D dengan jalan

mengaktifkan enzim-enzim yang berperan dalam pembuatan komponen dinding sel (Wattimena, 1991).

Kinetin yang ditambahkan dalam media ternyata menunjukkan beda nyata pada taraf 5%, tetapi hanya kinetin pada konsentrasi 1,5 mg/l saja yang efektif untuk meningkatkan laju pertumbuhan kalus, jadi kinetin dengan konsentrasi di bawah 1,5 mg/l belum mampu mendorong peningkatan laju pertumbuhan kalus. Hal ini dipengaruhi oleh berbagai faktor, menurut Salisbury dan Ross (1995) zat pengatur tumbuh yang ditambahkan dapat bersifat aktif, jika tiga bagian utama dalam sistem respon terpenuhi yaitu zat pengatur tumbuh harus ada dalam jumlah yang cukup di sel yang tepat, zat pengatur tumbuh harus dikenali dan diikat erat oleh protein penerima dalam jaringan sasaran dan protein penerima tersebut harus menyebabkan perubahan metabolik yang mengarah pada penguatan isyarat sehingga dapat menimbulkan respon.

Kinetin berfungsi mendorong pembelahan sel dan sintesis protein. Pemberian kinetin menyebabkan perubahan metabolisme sehingga terjadi penimbunan asam amino, fosfat dan gula di tempat-tempat pemberian sitokinin, hal ini menyebabkan pertumbuhan sel. Selain itu kinetin mempunyai struktur mirip adenin yang terdapat pada DNA dan RNA yang berperan dalam sintesis protein. Menurut Abidin (1982) zat pengatur tumbuh mempunyai peranan besar terhadap sintesis protein, pada proses pra transkripsi zat tumbuh terutama auksin mampu membebaskan DNA dari protein kompleks sehingga bisa terjadi proses transkripsi. Selain itu, menurut Wattimena (1991) zat pengatur tumbuh juga berinteraksi dengan molekul-molekul RNA mempengaruhi sintesis protein pada proses translasi.

Perbedaan laju pertumbuhan kalus selain dipengaruhi oleh peningkatan kecepatan pembelahan sel karena pengaruh pemberian 2,4-D dan kinetin juga dipengaruhi oleh kondisi genetis, umur jaringan dan jenis tanaman serta faktor lingkungan yang meliputi cahaya, kandungan O_2 , suhu dan kelembaban udara (Gunawan dkk., 1992).

Tabel 4. Berat kering kalus *T. paniculatum* (mg).

Penambahan 2,4-D	Penambahan Kinetin				Rerata
	0 mg/l	0,5 mg/l	1 mg/l	1,5 mg/l	
0 mg/l	194,10 ^d	185,40 ^d	244,50 ^{cd}	297,70 ^{abcd}	0,29 ^{AB}
0,5 mg/l	264,70 ^{bcd}	242,00 ^{cd}	255,10 ^{cd}	297,00 ^{abcd}	0,27 ^B
1 mg/l	325,90 ^{abc}	299,70 ^{abcd}	326,70 ^c	336,90 ^{abc}	0,32 ^{AB}
1,5 mg/l	366,80 ^{abc}	363,50 ^{abc}	384,60 ^{ab}	414,60 ^a	0,38 ^A
Rerata	0,29 ^{AB}	0,27 ^B	0,30 ^{AB}	0,34 ^A	

Keterangan: Angka-angka dalam kolom dan baris yang sama tidak berbeda nyata dalam DMRT pada taraf uji 5% jika dibelakangnya terdapat huruf yang sama.

Perlakuan dengan pemberian 0 mg/l 2,4-D dan 0,5 mg/l kinetin ternyata menghasilkan laju pertumbuhan kalus yang sangat rendah, disebabkan karena konsentrasi ZPT yang ditambahkan dalam media masih rendah, sehingga belum optimal untuk meningkatkan laju pertumbuhan kalus. Hal ini dapat dibuktikan dengan peningkatan konsentrasi ZPT yang ditambahkan dalam media dapat meningkatkan laju pertumbuhan kalus (Tabel 3).

Laju pertumbuhan kalus pada perlakuan pemberian 0 mg/l 2,4-D dan 0,5 mg/l kinetin bahkan berada di bawah kontrol hanya sebesar 9,90 mg/hr (Tabel 3), hal ini mungkin disebabkan karena perbedaan kondisi jaringan asal eksplan. Walaupun untuk semua perlakuan digunakan daun kedua tetapi keadaan tiap sel penyusunnya tidaklah sama. Menurut Lakitan (1996) setiap sel mempunyai kepekaan tersendiri terhadap zat tumbuh yang diberikan, selain itu waktu pembelahan sel untuk memperbanyak diri tidak sama karena siklus selnya berbeda-beda. Hal ini mungkin disebabkan karena sel anakan hasil pembelahan sebelumnya mempunyai ukuran yang berbeda sehingga siklus selnya juga berbeda. Menurut Reksoatmodjo (1993) apabila hasil pembelahan menghasilkan dua buah sel anakan yang tidak sama besar, maka siklus sel pada tahap G1 bagi sel anakan yang ukurannya kecil berlangsung lebih lama daripada sel anakan yang ukurannya besar.

Perbedaan laju pertumbuhan juga dipengaruhi oleh kemampuan jaringan untuk menyerap zat-zat hara yang tersedia, hal ini banyak dipengaruhi oleh aerasi dan tekstur kalus. Kalus yang terlalu padat dan kompak mempunyai kemampuan menyerap zat hara lebih rendah daripada tekstur kalus yang tidak terlalu padat.

Berat kering kalus

Pertumbuhan berkaitan dengan pertambahan volume dan jumlah sel, pembentukan protoplasma baru, pertambahan berat dan selanjutnya terjadi peningkatan berat keringnya (Gunawan dkk., 1992). Menurut Sitompul dan Guritno (1995) pengeringan bertujuan untuk menghentikan aktivitas metabolisme dari bahan tersebut. Berbeda dengan pengukuran berat basah yang masih dipengaruhi oleh lingkungan

dalam aktivitas metabolisme. Sehingga berat kering kalus lebih stabil dibandingkan berat basah kalusnya. Peningkatan berat kering kalus disebabkan oleh meningkatnya aktivitas metabolisme sel penyusun kalus.

Data hasil pengamatan untuk berat kering kalus menunjukkan hasil yang berbeda nyata. Berat kering tertinggi diperoleh dari perlakuan 1,5 mg/l 2,4-D dan 1,5 mg/l kinetin sebesar 414,60 mg (Tabel 4.). Hal ini menunjukkan

pemberian 2,4-D dan kinetin dapat memacu pertumbuhan kalus dan biomasanya, sebagaimana teramati dengan terjadinya penambahan ukuran dan berat kering kalus yang tidak dapat balik.

Berat kering kalus yang dihasilkan sangat tergantung kecepatan sel-sel tersebut membelah diri, memperbanyak diri yang dilanjutkan dengan pembesaran sel. Kecepatan sel membelah diri dapat dipengaruhi kombinasi auksin-sitokinin yaitu kombinasi 2,4-D dan kinetin yang ditambahkan dalam media. Penambahan zat pengatur tumbuh diduga dapat mempengaruhi metabolisme RNA yang berarti berperan dalam sintesis protein melalui proses transkripsi molekul RNA. Kenaikan sintesis protein sebagai sumber tenaga dapat digunakan untuk pertumbuhan sehingga dapat meningkatkan berat kering kalus (Gunawan dkk., 1992).

Penambahan ZPT dalam media untuk meningkatkan berat kering kalus menunjukkan hasil yang berbeda jika ZPT yang ditambahkan tanpa dikombinasikan. Penambahan 2,4-D dalam media menunjukkan beda nyata terhadap peningkatan berat kering kalus, semakin tinggi konsentrasi 2,4-D yang ditambahkan, semakin meningkatkan berat kering kalus. Efek peningkatan berat kering kalus ini berbeda jika ZPT yang ditambahkan dalam media adalah kinetin. Peningkatan berat kering kalus hanya terjadi pada perlakuan dengan pemberian kinetin 1,5 mg/l. Hal ini menunjukkan penambahan 2,4-D lebih efektif untuk meningkatkan berat kering kalus daripada kinetin (Tabel 4). Kinetin yang ditambahkan akan lebih efektif untuk meningkatkan berat kering kalus dengan cara meningkatkan konsentrasinya.

Pada umumnya berat kering kalus akan meningkat dengan peningkatan konsentrasi zat pengatur tumbuh yang diberikan, sebanding dengan peningkatan berat basah kalusnya. Tetapi ada beberapa perlakuan, peningkatan berat basah kalus tidak diikuti dengan peningkatan berat keringnya. Hal ini disebabkan karena kemampuan absorpsi air untuk tiap sel berbeda-beda. Sel-sel yang mempunyai berat basah besar mengandung banyak air, sehingga berat keringnya jauh lebih kecil; sehingga pada saat pengeringan, air yang

Tabel 5. Kandungan saponin kalus *T. paniculatum* (mg/g berat kering).

Penambahan 2,4-D	Penambahan kinetin				Rerata
	0 mg/l	0,5 mg/l	1 mg/l	1,5 mg/l	
0 mg/l	0,21 ^{ef}	0,20 ^f	0,28 ^{def}	0,35 ^{bcdef}	0,26 ^C
0,5 mg/l	0,31 ^{cdef}	0,28 ^{def}	0,30 ^{cdef}	0,35 ^{bcdef}	0,31 ^C
1 mg/l	0,39 ^{abcd}	0,37 ^{bcde}	0,40 ^{abcd}	0,42 ^{abcd}	0,40 ^B
1,5 mg/l	0,48 ^{ab}	0,46 ^{abc}	0,51 ^{ab}	0,55 ^a	0,50 ^A
Rerata	0,26 ^C	0,31 ^C	0,40 ^B	0,50 ^A	

Keterangan: Angka-angka dalam kolom dan baris yang sama tidak berbeda nyata dalam DMRT pada taraf uji 5% jika dibelakangnya terdapat huruf yang sama.

ada dalam sel akan menguap habis sehingga berat kering yang dihasilkannya pun kecil.

Kandungan saponin

Kultur jaringan dapat digunakan untuk memproduksi atau meningkatkan senyawa-senyawa metabolit sekunder dalam tanaman dibandingkan produksi senyawa yang sama secara alami. Dalam penelitian ini digunakan zat pengatur tumbuh untuk menginduksi pertumbuhan kalus *T. paniculatum* yang dapat menghasilkan saponin berkadar tinggi. Ada tidaknya saponin dalam kalus berkaitan dengan kondisi asal jaringan tanaman yang dipakai sebagai eksplan.

Ada beberapa tanaman yang mengandung senyawa metabolit sekunder tertentu dapat ditingkatkan produksinya melalui kultur jaringan, tetapi pada beberapa tanaman yang lain, kultur jaringan justru tidak berhasil meningkatkan kandungan metabolit tanaman (Gunawan, 1992). Ekspresi metabolit sekunder pada tanaman yang dikulturkan selain tergantung dari jenis eksplan yang dipakai juga terkait dengan jenis dan konsentrasi dari zat pengatur tumbuh yang ditambahkan dalam media. Pada kultur kalus *Costus speciosus*, penambahan 2,4-D meningkatkan sintesis diosgenin. Hasil ini akan berbeda pada kultur kalus *Orthosiphon aristatus*, 0,1 mg/l 2,4-D yang dikombinasikan dengan 1,0 mg/l BA merupakan zat pengatur tumbuh terbaik untuk merangsang produksi sinensetin.

Penelitian pendahuluan untuk mengetahui ada tidaknya saponin dalam daun kolesom dilakukan uji busa. Dari hasil pengamatan, daun kolesom mengandung saponin yang ditunjukkan dengan adanya busa yang stabil selama 30 menit dalam akuades. Penambahan 2,4-D dan kinetin dalam media memberikan laju pertumbuhan kalus dan kadar saponin yang berbeda nyata pada taraf 5% untuk meningkatkan kadar saponin dalam kalus. Semakin tinggi kombinasi konsentrasi zat pengatur tumbuh yang diberikan menyebabkan laju pertumbuhan dan kandungan saponin di dalam kalus semakin meningkat.

Laju pertumbuhan kalus tertinggi (96,40 mg/hr) dan kadar saponin tertinggi (0,55 mg/g berat kering kalus) diperoleh dari perlakuan kombinasi 1,5 mg/l 2,4-D dan 1,5 mg/l kinetin

pada masa inkubasi 5 minggu (Tabel 3 dan 5). Pola perubahan laju pertumbuhan dan kadar saponin dalam kalus adalah sama. Penambahan 2,4-D dan kinetin dalam media menyebabkan peningkatan pembelahan sel yang diikuti perbanyakan diri sehingga terjadi peningkatan laju pertumbuhan kalus diikuti dengan peningkatan kadar saponin dalam kalus. Hal ini menunjukkan bahwa dalam kultur kalus *T. paniculatum* saponin dibentuk oleh kalus yang aktif tumbuh. Kemungkinan besar

senyawa skualen pada kalus yang aktif tumbuh tidak diakumulasi terlebih dahulu, tetapi langsung diubah menjadi saponin. Skualen ini merupakan senyawa antara sintesis terpenoid yang dihasilkan melalui jalur asam mevalonat.

Kinetin merupakan salah satu jenis zat pengatur tumbuh yang mempunyai gugus isopentenil pirofosfat karena disintesis melalui jalur asam mevalonat (Salisbury dan Ross, 1995). Penambahan kinetin dalam media diduga dapat langsung digunakan untuk membentuk skualen melalui hidrolisis gugus isopentenil pirofosfatnya. Sedangkan pengaruh langsung 2,4-D terhadap sintesis skualen belum diketahui karena jalur biosintesis dan struktur 2,4-D tidak mempunyai kesamaan dengan saponin, tetapi menurut Wattimena (1991) kualitas dan posisi para dari asam fenoksiasetat sangat berpengaruh untuk merangsang pembentukan saponin dalam sel.

Zat pengatur tumbuh yang ditambahkan memberikan hasil yang berbeda-beda. Penambahan 2,4-D memberikan pengaruh yang berbeda nyata pada semua tingkat konsentrasi yang diujikan untuk peningkatan kandungan saponin kalus *T. paniculatum* (Tabel 5.). Penambahan 2,4-D efektif untuk meningkatkan produksi saponin kalus *T. paniculatum*. Penambahan 2,4-D pada konsentrasi yang rendah ternyata sudah dapat meningkatkan kadar saponin. Semakin tinggi konsentrasi 2,4-D yang ditambahkan dalam media, kadar saponin yang dihasilkan juga semakin meningkat.

Penambahan kinetin tanpa 2,4-D dalam media hanya efektif pada konsentrasi 1,5 mg/l untuk meningkatkan produksi saponin (Tabel 5.). Hal ini diduga karena kandungan sitokinin endogen tanaman *T. paniculatum* sangat rendah, sehingga diperlukan penambahan kinetin dengan konsentrasi yang tinggi untuk meningkatkan kadar saponin kalus. Menurut Salisbury dan Ross (1995) efek utama zat pengatur tumbuh adalah untuk mengatur proses pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Efek utama ini sering diikuti oleh sejumlah respon sekunder lainnya yang tergantung pada keadaan fisiologis sel sasarannya. Penguatan efek utama memegang peranan penting untuk dapat menimbulkan suatu

respon fisiologis sehingga penguatan efek utama harus terjadi karena sitokinin endogen terdapat dalam konsentrasi yang sangat rendah (0,01-0,1 μ M).

Berdasarkan uraian di atas, penambahan kinetin dengan konsentrasi 1,5 mg/l atau lebih akan lebih efektif untuk meningkatkan produksi saponin kultur kalus *T. paniculatum*, hal ini dimungkinkan karena untuk meningkatkan laju pertumbuhan kalus yang optimum diperlukan kinetin dengan konsentrasi 1,5 mg/l. Menurut Gunawan (1992), rendahnya hormon pada tanaman dapat disebabkan karena sel-sel pada tanaman tersebut mempunyai informasi genetik untuk memproduksi hormon tetapi tidak semua gen dapat mengekspresikan informasi tersebut sehingga apabila tanaman tersebut dikulturkan memerlukan zat pengatur tumbuh untuk pertumbuhan dan perkembangan tumbuhan itu sendiri.

Produksi saponin kalus *T. paniculatum* berkaitan dengan laju pertumbuhan dan berat kering kalus. Jika laju pertumbuhan kalusnya tinggi, saponin yang disintesis juga tinggi. Jadi, sintesis saponin terjadi selama pertumbuhan berlangsung. Aktivitas sel selama pertumbuhan seperti pembelahan sel, pertambahan volume dan akhirnya terjadi proliferasi sel dapat ditingkatkan dengan pemberian zat pengatur tumbuh. Peningkatan pembelahan sel oleh pengaruh zat pengatur tumbuh dapat memacu laju pertumbuhan dan peningkatan biomasa kalus yang akhirnya dapat meningkatkan berat kering kalus seiring dengan peningkatan produksi saponinnya.

Pemberian zat pengatur tumbuh dapat mempengaruhi produksi metabolit sekunder, hal ini disebabkan zat pengatur tumbuh yang ditambahkan dapat menyebabkan perubahan fisiologi dan biokimia tumbuhan melalui pengaturan kerja enzim. ZPT akan menginduksi sintesis enzim yang ekspresinya tergantung sintesis RNA dan protein. Peningkatan jumlah enzim yang terlibat dalam metabolit sekunder juga akan meningkatkan senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan. Menurut Wattimena (1991) enzim memegang peranan penting dalam setiap proses metabolisme maka setiap proses yang dapat mengatur sintesis, aktivasi, perombakan dan inaktivasi dari enzim mempunyai pengaruh yang nyata terhadap proses fisiologi dan biokimia tanaman.

Zat pengatur tumbuh berperan dalam pengikatan membran protein yang berpotensi untuk aktivitas enzim. Hasil pengikatan ini mengaktifkan enzim tersebut dan mengubah substrat menjadi beberapa produk baru. Produk baru yang terbentuk ini menyebabkan serentetan reaksi-reaksi sekunder salah satunya adalah pembentukan metabolit sekunder (Wattimena, 1991). Zat pengatur tumbuh (2,4-D dan kinetin) terikat pada membran protein penerima di membran plasma sel. Kompleks ikatan ini mengaktifkan enzim fosfolipase C (PLC). Enzim PLC ini menghidrolisis fosfatidil inositol 4,5-

bifosfat (P_1P_2) menghasilkan inositol 1,4,5-trifosfat (IP_3) dan diasil gliserol (DAG). IP_3 bergerak menuju vakuola sehingga menyebabkan terlepasnya Ca^{2+} simpanan masuk ke dalam sitosol. Meningkatnya konsentrasi Ca^{2+} di sitosol menyebabkan empat buah Ca^{2+} bergabung membentuk kompleks dengan kalmodulin tidak aktif menjadi kalmodulin aktif, hal ini mengaktifkan beberapa enzim yang berperan dalam sintesis saponin seperti enzim kinase, skualen sintetase dan enzim NAD^+ kinase. Sedangkan DAG yang tidak larut dalam air berfungsi dalam membran plasma. DAG mengaktifkan enzim pada membran yaitu protein kinase c (PKC). Enzim ini menggunakan ATP untuk memfosforilasi beberapa enzim tertentu yang mengatur pada tahap-tahap metabolisme (Salisbury dan Ross, 1995).

Pengendalian beberapa enzim tertentu sesudah terjadi penerimaan hormon awal dapat mempengaruhi ekspresi gen yang dapat menyebabkan serangkaian proses-proses metabolisme. Zat pengatur tumbuh yang ditambahkan bergabung dengan sejumlah protein penerima kemudian kompleks ZPT-protein penerima bergerak masuk ke dalam inti mempengaruhi aktivitas gen. Aktivitas gen dimulai dengan proses transkripsi DNA menjadi mRNA, yang diikuti oleh translasi mRNA. Selanjutnya, mRNA meninggalkan inti menuju sitosol. Di sitosol, mRNA ditranslasikan di ribosom. Translasi mRNA menyebabkan terbentuknya enzim-enzim baru dan mengaktifkan enzim-enzim tertentu yang mengarah pada proses pertumbuhan dan perkembangan serta sintesis senyawa metabolit sekunder melalui pengaturan kerja enzim (Salisbury dan Ross, 1995).

Tahap awal pembentukan saponin berasal dari proses glikolisis membentuk asam piruvat. Asam piruvat yang terbentuk dioksidasi membentuk asetil ko-A. Asetil ko-A merupakan sumber atom karbon dalam sintesis saponin (Manitto, 1992). Biosintesis saponin dapat dibagi menjadi lima tahap, yaitu: (i) mevalonat, yang merupakan senyawa enam karbon disintesis dari asetil ko-A, (ii) unit isoprenoid dibentuk dari mevalonat melalui pelepasan CO_2 , (iii) enam unit isoprenoid mengadakan kondensasi untuk membentuk senyawa antara yaitu skualen, (iv) skualen mengalami siklisasi untuk menghasilkan senyawa terpenoid, (v) senyawa terpenoid ini akan berikatan dengan glukosa membentuk saponin (Murray *et al.*, 1996; Hopkins, 1999).

Rendahnya produksi saponin dalam kultur kalus *T. paniculatum* kemungkinan disebabkan: (i) struktur kalus merupakan kumpulan dari banyak sel, (ii) sel-sel yang membangun kalus mempunyai fase pertumbuhan tidak seragam, (iii) kurangnya aerasi dalam kultur kalus, (iv) masa inkubasi yang kurang lama. Struktur kalus yang padat, menyebabkan sel-sel di lapisan dalam tidak dapat mengadakan kontak langsung

dengan medium, sehingga aktivitas sintesis yang terjadi di dalam setiap sel juga berbeda. Hal ini dapat mengurangi jumlah senyawa yang dihasilkan (sedikit). Kurangnya aerasi menyebabkan skualen banyak yang terakumulasi sehingga saponin yang dihasilkan sedikit. Menurut Toruan (1990) dalam kultur kalus yang aerasinya sedikit, banyak dijumpai prekursor steroid yaitu skualen, hal ini disebabkan siklus skualen dalam sistem biologi memerlukan O_2 yang cukup, Masa inkubasi yang kurang lama menyebabkan produksi saponin yang dihasilkan kurang optimum. Hal ini dimungkinkan karena kepekaan sel-sel penyusun jaringan terhadap zat pengatur tumbuh yang diberikan tidak sama.

Penggunaan kultur suspensi sel biasanya lebih efektif untuk meningkatkan kandungan senyawa metabolit sekunder. Aerasi dalam kultur suspensi sel bagus karena susunan selnya terpisah antara satu dengan yang lain yang memungkinkan semua selnya dapat mengadakan kontak langsung dengan medium sehingga produksi metabolit sekunder yang dihasilkan lebih tinggi daripada kultur kalus, seperti pada kultur kalus *Costus speciosus* dengan penambahan 2,4-D dalam medium dapat meningkatkan kandungan diosgenin sebesar 1,34% berat keringnya sedangkan dengan menggunakan kultur suspensi sel, kandungan diosgenin dapat ditingkatkan sampai 1,70% berat keringnya (Toruan, 1990).

Produksi saponin akan meningkat seiring peningkatan konsentrasi 2,4-D dan kinetin yang ditambahkan, tetapi untuk perlakuan dengan penambahan 2,4-D 0 mg/l dan kinetin 0,5 mg/l kandungan saponin yang dihasilkan justru lebih rendah daripada kontrol hanya sebesar 0,20 mg/g berat kering (Tabel 5.). Hal ini disebabkan karena pada perlakuan ini laju pertumbuhan kalusnya rendah (Tabel 3.), maka saponin yang dihasilkanpun sedikit. Hal ini dimungkinkan karena pola peningkatan laju pertumbuhan kalus dan kadar saponin sama.

KESIMPULAN

Penambahan 2,4-D dan kinetin dalam media dapat meningkatkan laju pertumbuhan kalus *T. paniculatum* secara *in vitro*. Penambahan 1,5 mgL^{-1} 2,4-D dan 1,5 mgL^{-1} kinetin dalam media merupakan konsentrasi yang optimum untuk meningkatkan laju pertumbuhan kalus *T. paniculatum* secara *in vitro*. Penambahan 2,4-D dan kinetin dalam media dapat meningkatkan kadar saponin kalus *T. paniculatum* secara *in vitro*. Penambahan 1,5 mgL^{-1} 2,4-D dan 1,5 mgL^{-1} kinetin dalam media merupakan konsentrasi yang optimum untuk meningkatkan kadar saponin kalus *T. paniculatum* secara *in vitro*.

DAFTAR PUSTAKA

- Abidin, Z. 1982. *Dasar-dasar Pengetahuan tentang Zat Pengatur Tumbuh*. Bandung: Penerbit Angkasa.
- Gunawan, L.W., G.A. Wattimena, N.A. Mattjik, E. Syamsudin, N.M.A. Wiendi, dan A. Ernawati. 1992. *Bioteknologi Tanaman*. Bogor: PAU Bioteknologi IPB.
- Harborne, J.B. 1996. *Metode Fitokimia*. Penerjemah: Padmawinata, K. dan I. Sudiro. Bandung: ITB Press.
- Hendaryono, D.P.S., dan A. Wijayani. 1994. *Teknik Kultur Jaringan*. Yogyakarta: Penerbit kanisius.
- Heyne, K. 1987. *Tumbuhan Berguna Indonesia II*. Jakarta: Yayasan Sarana Wijaya.
- Hopkins, W.G. 1999. *Introduction to Plant Physiology*. New York: John Wiley and Sons.
- Hutapea, J.R. 1991. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia II*. Jakarta: Depkes RI.
- Ignacimuthu, S. 1997. *Plant Biotechnology*. New York: Science Publisher, Inc.
- Jokopriyambodo, W., S. Wahyono, dan Djumidi. 1999. Organogenesis batang som jawa (*T. paniculatum*) secara *in vitro*. *Warta Tumbuhan Obat Indonesia* 5 (4): 1-2.
- Kurz, W.G.W., dan F. Constabel. 1991. Produksi dan isolasi metabolit sekunder. Dalam Wetter, L.R. dan F. Constabel (eds.). *Metode Kultur Jaringan Tanaman*. Penerjemah: Widiyanto, M.B. Bandung: ITB Press.
- Lakitan, B. 1996. *Fisiologi Pertumbuhan dan Perkembangan Tanaman*. Jakarta: PT. Raja Grafindo Persada.
- Lestari, E.G., dan I. Mariska. 1997. Kultur *in vitro* sebagai metode pelestarian tumbuhan obat langka. *Buletin Plasma Nuftah* 2 (1): 298-305.
- Manitto, P. 1992. *Biosintesis Produk Alami*. Penerjemah: Koensoemardiyah. Semarang: IKIP Press.
- Murray, R.K., D.K. Granner, P.A. Mayes, and V.W. Rodwell. 1996. *Biokimia Harper*. Penerjemah: Hartono, A. Jakarta: Buku Kedokteran EGC.
- Reksoatmodjo, S.M.I. 1993. *Biologi Sel*. Yogyakarta: UGM Press.
- Robinson, T. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. Bandung: ITB Press.
- Salisbury, F.B. and C.W. Ross. 1995. *Fisiologi Tumbuhan*. Penerjemah: Lukman, D.R. dan Sumaryono. Bandung: ITB Press.
- Saroni, N., Y. Astuti, dan Adjirni. 1999. Pengaruh infus akar som jawa (*T. paniculatum*) terhadap jumlah dan motilitas spermatozoa pada mencit. *Warta Tumbuhan Obat Indonesia* 5 (4): 13-14.
- Sitompul, S.M., dan B. Guritno. 1995. *Analisis Pertumbuhan Tanaman*. Yogyakarta: UGM Press.
- Stahl, E. 1985. *Analisis Obat secara Kromatografi dan Mikroskopi*. Penerjemah: Padmawinata, K. dan I. Sudiro. Bandung: ITB Press.
- Sumastuti, R. 1999. Efek antiradang infus daun dan akar som jawa (*T. paniculatum*) pada tikus putih *in vivo*. *Warta Tumbuhan Obat Indonesia* 5 (4): 15-17.
- Toruan, N., Solahuddin, S.M Winata, Sastradipradja, dan K. Padmawinata. 1990. Pengaruh 2,4-D, kolesterol Co-60 terhadap pertumbuhan dan kandungan diosgenin dalam kultur jaringan *Costus speciosus*. *Forum Pascasarjana* 1 (13): 1-14.
- Wattimena, G.A. 1991. *Zat Pengatur Tumbuh*. Bogor: PAU Bioteknologi IPB.