

PENGARUH PENAMBAHAN SITOKININ PADA SENYAWA FLAVONOID KALUS (*Echinacea purpurea* L)

Heru Sudrajad, Saryanto

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional
Badan Penelitian dan Pengembang Kesehatan Kementerian Kesehatan RI

ABSTRAK

Kultur jaringan dapat dimanfaatkan untuk menghasilkan metabolit sekunder. *Echinacea purpurea* L merupakan salah satu tanaman obat yang berkhasiat merangsang sistem kekebalan tubuh (imunostimulator). Tujuan penelitian adalah untuk mengetahui pengaruh Benzyl aminopurin terhadap kalus dan senyawa flavonoid *Echinacea purpurea* L pada media Murashige dan Skoog (MS). Pelaksanaan penelitian yaitu eksplan dari daun *Echinacea purpurea* L ditumbuhkan pada media MS yang diperkaya dengan zat pengatur tumbuh Benzyl aminopurin (BAP) dengan konsentrasi 1, 2, 3 dan 4 mg/l. Hasil kalus yang diperoleh kemudian dilakukan uji reaksi warna dengan kertas kromatografi (kuantitatif), kemudian dilanjutkan dengan spektrofotometri (kuantitatif). Sebagai pembandingan daun tanaman asal *Echinacea purpurea* L juga dilakukan uji yang sama. Hasil yang diperoleh menunjukkan keberhasilan membentuk kalus 80% pada konsentrasi BAP 3 dan 4 mg/l dengan rata-rata waktu induksi kalus 4,7 - 5,6 hari. Hasil reaksi warna menunjukkan noda warna merah yang menunjukkan adanya flavonoid. Kadar flavonoid total kalus *Echinacea purpurea* L pada konsentrasi 4 mg/l yaitu 0,28%. Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa penambahan BAP dapat meningkatkan pertumbuhan kalus secara kultur jaringan dan mempunyai kadar flavonoid 0,28 % sama dengan daun *Echinacea purpurea* L.

Kata kunci : *Echinacea purpurea* L, Benzyl aminopurin , Murashige dan Skoog

PENDAHULUAN

Tanaman obat mempunyai peranan yang sangat besar dalam bidang kesehatan dikarenakan dapat memproduksi zat-zat kimia yang memiliki kegunaan yang potensial dalam pengobatan.

Kultur jaringan dapat dimanfaatkan untuk menghasilkan metabolit sekunder dari suatu tanaman. Kultur jaringan tanaman hanya mengambil jaringan yang cukup kecil dan pengembangannya di atas media yang sesuai dalam waktu yang relatif singkat (Suryowinoto, 1985). Metabolit sekunder merupakan hasil dari proses biokimia yang terjadi dalam tubuh tanaman. Proses-proses tersebut juga terjadi pada teknik kultur jaringan, oleh karena itu kultur jaringan dapat digunakan sebagai sarana penghasil metabolit sekunder (Dalimoenthe, 1987).

Sitokinin merupakan salah satu dari golongan zat pengatur tumbuh yang berpengaruh terhadap pertumbuhan dengan teknik jaringan. Benzil aminopurin merupakan zat pengatur tumbuh golongan sitokinin. Sitokinin adalah turunan adenin, yang berperan sangat penting dalam pengaturan pembelahan sel dan morfogenesis (Gunawan, 1987)

Echinacea purpurea L merupakan salah satu tanaman obat yang berkhasiat merangsang sistem kekebalan tubuh (imunostimulator). *Echinacea* mengandung komponen kimia seperti polisakarida, flavonoid, turunan *caffeic acid* (*cichoric acid*,

chlorogenic acid, cinarin, echinoside), poliasetilen, minyak-minyak esensial dan alkil amida (Anonim, 1987). Kandungan yang lain adalah alkamid pada umumnya isobutilamid, ester asam kafein terutama echinacoside dan cinarin, polisakarida, echinolon, betaine dan minyak atsiri khususnya humulun (Kadans Josep, 1978).

Flavonoid adalah senyawa polifenol yang mengandung 15 atom karbon dalam inti dasarnya yang tersusun dalam konfigurasi C6-C3-C6, yaitu dua cincin aromatik yang dihubungkan oleh satuan tiga karbon yang dapat atau tak dapat membentuk cincin ketiga. Flavonoid merupakan kandungan khas tumbuhan hijau dengan mengecualikan alga (Markham, 1988). Senyawa flavonoid dalam jaringan tumbuhan lazimnya ditemukan sebagai senyawa campuran dan jarang sekali ditemukan sebagai senyawa tunggal (Harborne, 1987). Flavonoid banyak terdapat antara lain dalam familia Poligonaceae, Rutaceae, Leguminosae, Umbeliferae dan Asteraceae (Markham, 1988).

Analisis kuantitatif adalah penentuan jumlah dan kadar suatu zat. Penentuan kadar flavonoid dalam tanaman dapat dilakukan secara spektrofotometri. Prinsip kerjanya adalah pembentukan kompleks dengan $AlCl_3$, sehingga memberikan serapan pada panjang gelombang 425 nm. Dari hal-hal tersebut diatas maka dilakukan penelitian pengaruh penambahan sitokinin pada senyawa flavonoid kalus *Echinacea purpurea* L.

METODOLOGI

Bahan Penelitian

Bahan penelitian yang digunakan berupa tanaman *Echinacea purpurea* L. bahan penyusun media MS (Murashige & Skoog), Benzil amonopurin (BAP), HCl, KOH, Dithane M-45 (0,5%), byclean 10%, alkohol 70%, aquadest steril, detergen, spiritus, ethanol, kertas Whatman.

Alat Penelitian

Alat yang digunakan meliputi *Laminair Air Flow* (LAF), autoklaf, ruang inkubasi yang dilengkapi lampu TL, timbangan analitis, shaker, *hot plate*, oven, botol kultur, penyemprot, lampu UV, *chamber* dan Spektrofotometer.

Jalannya Penelitian

Tanaman *Echinacea purpurea* L diambil dari kebun koleksi Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional pada umur kurang lebih 5 bulan, tanaman dengan pertumbuhan yang baik, yaitu masih terdapat banyak daun muda, regenerasi daun masih berjalan dengan cepat dan tanaman belum berbunga. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun *Echinacea purpurea* yang masih muda, terletak pada daun yang ke-2 dan ke-3. Tanaman yang akan digunakan sebagai eksplan dikarantina dahulu dalam rumah kaca.

Tahap pertama eksplan dicuci air mengalir, direndam larutan detergen 1% selama 3 menit, dicuci, direndam larutan Dithane M-45 2-3%. Kemudian daun dibilas aquadest steril 3 kali dalam LAF, dan dimasukkan dalam larutan byclean 10% selama 15 menit, dicuci aquadest steril 3-4 kali, selanjutnya eksplan dipindah dalam cawan petridish steril kemudian dipotong kecil ukuran 1 x 1 cm dengan pisau skalpel dan siap ditanam. Tahapan selanjutnya penanaman eksplan, dilakukan di dalam LAF yang sebelumnya sudah disemprot dengan alkohol dan disinari lampu UV selama 30 menit. Eksplan ditanam pada media MS yang diperkaya dengan zat pengatur tumbuh BAP dengan konsentrasi 1, 2, 3 dan 4 mg/L.

Tabel I. Komposisi media Murashige dan Skoog (MS) (mg/L)

Makronutrien		1900
	KNO_3	1650
	NH_4NO_3	440
	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	370
	$MgSO_4$	170
	KH_2PO_4	
Mikronutrien		22,3
	$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	6,2
	H_3BO_3	8,6
	$ZnSO_4 \cdot 4H_2O$	0,25
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,025
	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,025
	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,83
	KI	
Besi		27,8
	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	37,3
	$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	
Vitamin		0,5
	Niacin	2
	Glicine	0,5
	Pyridoxine HCl	0,1
	Thiamine HCl	
	Myo-Inositol	100
	Sukrosa	30.000

(Gunawan, 1987)

Eksplan diinkubasi, pengamatan dan pendataan pertumbuhan eksplan dalam inkubator dilakukan secara teratur. Pengamatan dilakukan terhadap perubahan eksplan dan pembentukan kalus. Kalus dipanen untuk pemeriksaan kandungan flavonoid baik secara kualitatif dan kuantitatif.

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

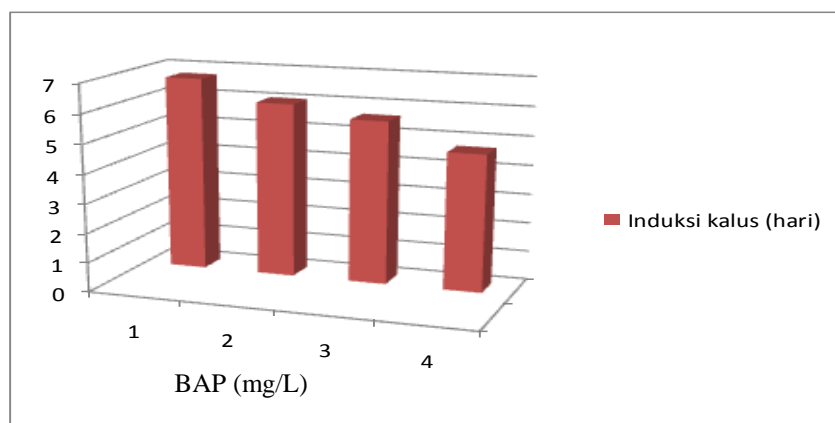
Berdasar hasil penelitian pengaruh pemberian zat pengatur tumbuh terhadap waktu induksi kalus dan prosentase keberhasilan penanaman eksplan dengan menghitung jumlah eksplan yang berhasil tumbuh membentuk kalus, dibagi jumlah keseluruhan eksplan yang ditanam dikalikan 100%. disajikan pada Tabel II.

Tabel II. Pengaruh pemberian Benzil aminopurin terhadap waktu induksi kalus dan prosentase keberhasilan membentuk kalus *Echinacea purpurea* L

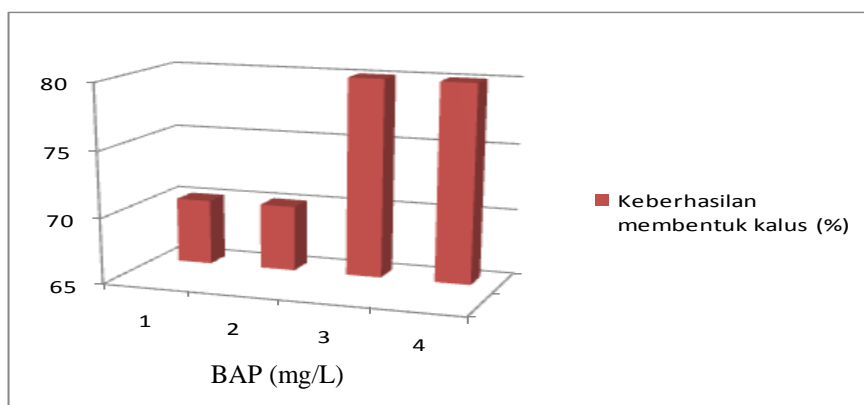
Perlakuan	Waktu induksi kalus rata-rata (hari)	Prosentase keberhasilan membentuk kalus (%)
Benzil aminopurin 1 mg/l	6,7	70

Benzil aminopurin 2 mg/l	6,0	70
Benzil aminopurin 3 mg/l	5,6	80
Benzil aminopurin 4 mg/l	4,7	80

Pertumbuhan kalus pada media MS yang diperkaya dengan hormon BAP 3 dan 4 mg/l induksi kalus terjadi pada hari ke 5-7 dengan pembentukan kalus yang optimal, ditandai terbentuknya kalus pada seluruh eksplan. Hormon BAP berpengaruh besar terhadap pembentukan kalus dari daun *Echinacea purpurea* L. Menurut Gunawan (1987), Benzil aminopurin merupakan zat pengatur tumbuh golongan sitokinin, yaitu adalah turunan adenin, yang sangat penting dalam pengaturan pembelahan sel dan morfogenesis.



Gambar 1. Diagram pengaruh BAP terhadap waktu induksi kalus *Echinacea purpurea* L



Gambar 2. Diagram pengaruh BAP terhadap prosentase keberhasilan membentuk kalus *Echinacea purpurea* L



Gambar 3. Kalus *Echinacea purpurea* L diperkaya BAP 4 mg/L

Kandungan flavonoid dalam kalus dan daun tanaman asal diperiksa dengan reaksi warna dilanjutkan dengan kromatografi kertas. Hasil pengujian dapat dilihat pada Tabel III dan IV.

Tabel III. Hasil reaksi warna kalus dan daun *Echinacea purpurea* L

Sampel	Pereaksi				Interpretasi
	Amonia	H ₂ SO ₄ pekat	NaOH 10%	Tes Willstater	
BAP 1 mg/l	Kuning	Merah kekuningan	Kuning	Hijau	Flavonoid
BAP 2 mg/l	Kuning	Merah kekuningan	Kuning	Hijau	Flavonoid
BAP 3 mg/l	Kuning	Merah kekuningan	Kuning	Hijau	Flavonoid
BAP 4 mg/l	Kuning	Merah kekuningan	Kuning	Hijau	Flavonoid
Tanaman asal	Kuning	Merah kekuningan	Kuning	Hijau	Flavonoid

Uji pendahuluan golongan flavonoid dapat dideteksi dengan larutan NH₃ dan memberikan warna spesifik untuk masing-masing golongan. Setelah ekstrak ditambah dengan larutan amonia terjadi warna kuning baik pada kalus maupun tanaman asal. Hal ini disebabkan karena flavon dan flavonol memberikan warna kuning sampai kuning kemerahan bila direaksikan dengan NH₃. Antosian akan berwarna merah biru sedangkan flavonol akan memberikan warna orange atau coklat. Warna merah dan lembayung yang terjadi secara tiba-tiba dalam suasana asam disebabkan adanya auron dan khalkon. Pemeriksaan flavonoid pada ekstrak tanaman dengan penambahan HCl kemudian direduksi dengan serbuk Mg memberikan warna dari merah orange, merah atau magenta, terkadang hijau atau biru (Guevara dan Recio, 1985).

Tabel IV. Data kromatografi kertas pada kalus dan daun *Echinacea purpurea* L

Sampel	Nilai		Pereaksi		Interpretasi
	hRf	UV 366 nm	Uap Amonia	Pereaksi Sitroborat	
BAP 1 mg/l	91	Merah jingga	Kuning	Hijau kekuningan	Flavonoid
BAP 2 mg/l	91	Merah jingga	Kuning	Hijau kekuningan	Flavonoid
BAP 3 mg/l	89	Merah jingga	Kuning	Hijau kekuningan	Flavonoid
BAP 4 mg/l	89	Merah jingga	Kuning	Hijau kekuningan	Flavonoid
Tanaman asal	89	Merah jingga	Kuning	Hijau kekuningan	Flavonoid

Hasil kromatografi kertas dengan fase gerak n-butanol : asam asetat : air (4 : 1 : 5) adalah bercak berwarna merah jingga pada UV 266 nm. Hal ini menunjukkan bahwa deteksi terhadap bercak tersebut senyawa golongan flavonoid (Robinson, 1995).

Data penetapan kadar flavonoid total pada kalus dengan pertumbuhan mencapai 80% dan daun *Echinacea purpurea* L dengan metode Christ dan Muller pada Tabel V.

Tabel V. Kadar flavonoid total kalus dan daun *Echinacea purpurea* L.

Sampel	Kadar flavonoid total (%)
Kalus hasil penambahan BAP 3 mg/l	0,29
Kalus hasil penambahan BAP 4 mg/l	0,28
Daun tanaman asal	0,28

Penetapan kadar flavonoid total dari kalus dan tanaman *Echinacea purpurea* L hasil perlakuan dengan BAP 3 mg/l diperoleh 0,29%, pada BAP 4 mg/l diperoleh 0,28% dan pada tanaman asal juga 0,28%. Kadar flavonoid tersebut menunjukkan hasil yang hampir sama antara hasil induksi kalus dengan tanaman asal, bahkan pada BAP 3 mg/l terjadi peningkatan. Hal ini menunjukkan bahwa kalus daun yang diperoleh secara kultur jaringan dapat digunakan sebagai alternatif untuk menghasilkan metabolit sekunder.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

1. Pemberian zat pengatur tumbuh BAP berpengaruh nyata terhadap induksi kalus daun *Echinacea purpurea* L. dengan waktu induksi kalus rata-rata 5-7 hari

2. Penambahan BAP pada konsentrasi 4 mg/l diperoleh waktu induksi kalus rata-rata 4,7 hari dan prosentase keberhasilan membentuk kalus 80 % dengan kadar flavonoid total kalus *Echinacea purpurea* L yaitu 0,28%.

Saran

Disarankan untuk dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap asal eksplan dan untuk mengetahui senyawa lain dalam kalus daun *Echinacea purpurea* L.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 1987. *Analisis Obat tradisional*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta
- Dalimoenthe, S.L., 1987. *Kultur Jaringan Sebagai Sarana untuk Menghasilkan Metabolit Sekunder*. Risalah Seminar nasional Metabolit Seknder. PAU Bioteknologi UGM. Yogyakarta
- Gunawan L.W. 1987. *Teknik Kultur Jaringan*. Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman. PAU Bioteknologi. IPB Bogor.
- Harborne, J.B., 1987. *Metode Fitokimia. Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*, diterjemahkan oleh Kosasih Padmaewinata dan Iwang Soediro, Edisi II, Penerbit ITB. Bandung
- Markham, K.H., 1988. *Cara mengidentifikasi Flavonoid*, diterjemahkan oleh Fitokimia. Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan, diterjemahkan oleh Kosasih Padmaewinata dan Iwang Soediro, Edisi II, Penerbit ITB. Bandung
- Suryowinoto, 1991. *Budidaya Jaringan Tanaman Terobosan Bermanfaat dalam Bioteknologi*. Fakultas Biologi. UGM. Yogyakarta.