

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tumbuhan Purwoceng

2.1.1. Tempat Tumbuh

Purwoceng biasa tumbuh di pegunungan yang berhawa sejuk. Akar tumbuhan tersebut berbau wangi, tingginya sekitar 15 - 20 cm, tempat tumbuhnya pada dataran tinggi antara 2000 - 3000 meter di atas permukaan laut. Di Jawa Barat hanya terdapat di Gunung Galunggung dan Gunung Pangrango, sedangkan di Jawa Tengah terdapat di Dataran Tinggi Dieng yaitu di sekitar Desa Si Kunang (Heyne, 1987; Anonim, 1990; Anonim, 1993).

2.1.2. Morfologi

Purwoceng merupakan tumbuhan terna annual, mempunyai ciri-ciri sebagai berikut: batang berongga, permukaan beralur; daun majemuk berganda, pangkal tangkainya melebar menjadi upih, duduknya tersebar, jarang berhadapan, tanpa daun penumpu; bunga majemuk berupa payung, kebanyakan banci; kelopak kecil berlekuk lima, menempel pada bakal buah; mahkota terdiri atas daun mahkota yang bebas dengan ujungnya membengkok ke dalam dan cepat gugur; benangsari lima berseling dengan daun mahkotanya, kepala sari beruang dua, membuka dengan celah membujur; bakal buah tenggelam, tertutup oleh dua pangkal tangkai putik yang menebal, beruang dua, tiap ruang dengan satu bakal biji; buahnya berbagi berusuk, bila masak terpisah menjadi dua bagian berisi biji; terdapat saluran-saluran minyak dalam akar, batang, dan kulit buah, sejajar satu

dengan yang lain; biji dengan endosperm seperti tanduk (Tjitrosoepomo, 1988). Panjang tangkai daun purwoceng \pm 2 cm. Bagian tanaman yang berkhasiat sebagai obat adalah umbi akarnya yang menghujam ke dalam tanah seperti wortel, tetapi lebih kecil dan warnanya putih kecoklatan (Heyne, 1987; Anonim, 1990).

2.1.3. Klasifikasi

Purwoceng, di Jawa Barat (Sunda) disebut “antanan gunung”, di Jawa Tengah dan Jawa Timur disebut “gebangan depok”, “purwa aceng”, “P. ceng”, “rumput dempa”, atau “suri pandak abang” (Heyne, 1987; Anonim, 1990).

Kalsifikasi tumbuhan purwoceng menurut Tjitrosoepomo (1988):

Divisio	: Spermatophyta
Sub-divisio	: Angiospermae
Klasis	: Dicotyledonae
Ordo	: Umbelliflorae
Familia	: Umbelliferae
Genus	: Pimpinella
Spesies	: <i>Pimpinella alpina</i> Kds.

2.2. Kultur Jaringan Tanaman

Kultur jaringan *in vitro* adalah suatu metode untuk mengisolasi bagian dari tanaman, seperti protoplasma, sel, jaringan, organ, serta menumbuhkannya dalam kondisi aseptik, sehingga bagian-bagian tersebut dapat memperbanyak diri dan beregenerasi menjadi tanaman lengkap kembali (Herawan dan Hendrati, 1996).

Menurut Gunawan (1995) manfaat teknik kultur *in vitro* antara lain :

1. Membantu perbanyak vegetatif tanaman dalam rangka penyediaan bibit dari induk superior.
2. Menyediakan bibit tanaman yang bebas virus.
3. Membantu program pemuliaan tanaman untuk menghasilkan tanaman yang lebih baik.
4. Membantu proses konservasi dan preservasi plasma nutfah tanaman.
5. Produksi persenyawaan kimia untuk keperluan farmasi dan pewarna untuk industri makanan dan kosmetik.
6. Sarana memperbanyak tanaman yang mempunyai persentase perkecambahan biji rendah.

Keberhasilan *in vitro* dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu:

1. Eksplan

Eksplan merupakan bagian tanaman (sel, jaringan, dan organ) yang dijadikan bahan inokulum awal yang ditanam dalam media, kemudian akan menunjukkan pertumbuhan dan perkembangan tertentu (Gunawan, 1995). Bagian tanaman yang digunakan sebagai eksplan sebaiknya merupakan bagian tanaman yang mempunyai sel aktif membelah dan berasal dari tanaman induk yang sehat dan berkualitas. Menurut George and Sherrington (1984) ukuran eksplan sangat berpengaruh terhadap keberhasilan *in vitro*. Apabila eksplan terlalu kecil menyebabkan ketahanan eksplan yang kurang baik dalam kultur dan apabila eksplan terlalu besar, akan mudah terkontaminasi oleh mikroorganisme.

Menurut George and Sherrington (1984) kontaminasi oleh berbagai mikroorganisme dapat dikurangi dengan mencuci eksplan dengan air yang mengalir selama beberapa waktu. Perendaman di dalam air juga dapat membuat kontaminasi permukaan eksplan mudah dihilangkan dengan sterilisasi. Konsentrasi dan lamanya sterilisasi untuk setiap jenis eksplan tidaklah sama, tergantung dari jenis dan organ tanaman yang digunakan.

Desinfektan yang biasa digunakan untuk sterilisasi eksplan adalah etil alkohol atau isopropil alkohol (C_2H_5OH) 70 %, kalsium hipoklorida 0,8%, hidrogen peroksida (H_2O_2) 3%, merkuri klorida ($HgCl_2$) 0,1 %, antiformin ($NaClO$), benzalkonium klorida (zephizan) 0,1 % (Herawan dan Hendrati, 1996).

2. Medium

Medium yang digunakan dalam kultur jaringan ada dua macam, yaitu media padat dan media cair. Medium padat digunakan untuk kultur kalus atau kultur organ tanaman (George dan Sherrington, 1984). Salah satu medium untuk menumbuhkan kalus adalah medium MS. Komposisi medium MS dapat digunakan untuk hampir semua jenis kultur, terutama pada tanaman dikotil. Hasil penelitian membuktikan bahwa medium MS paling banyak digunakan, karena mengandung makronutrien dan mikronutrien yang lebih tinggi dibandingkan dengan makronutrien dan mikronutrien yang terdapat dalam medium kultur lainnya (George and Sherrington, 1984; Hendaryono dan Wijayani, 1994). Medium MS juga mengandung campuran nitrat dan amonium sebagai sumber nitrogen, dan kandungan potasium yang tinggi (Street, 1977). Total nitrogen yang diperlukan dalam berbagai medium kultur sekitar 12-60 mmol/l yaitu 6-20 mmol/l

diperoleh dari NH_4^+ , dan 6-40 mmol/l diperoleh dari NO_3^- . Keduanya diperlukan untuk keseimbangan pertumbuhan dan perkembangan yang optimal. Apabila dalam medium konsentrasi NH_4^+ terlalu tinggi, pH medium akan turun dan medium agar menjadi cair (Pierik, 1987). Konsentrasi amonium nitrat dalam berbagai formulasi medium kultur sangat bervariasi yaitu antara 60-2000 mg/l. Sumber nitrogen dalam medium MS diperoleh dari amonium nitrat (NH_4NO_3) dan kalium nitrat (KNO_3) yang mengandung $\pm 40 \text{ mM}$ yang berasal dari NO_3^- dan $\pm 20 \text{ mM}$ yang berasal dari NH_4^+ . (George and Sherrington, 1984; Pierik, 1987).

Komponen-komponen dalam medium kultur *in vitro*:

a. Makronutrien

Makronutrien dalam medium terdiri dari 6 elemen yaitu N, P, K, Ca, Mg dan S. Bila salah satu dari unsur tersebut dihilangkan dari medium, maka kultur akan mati (Gunawan, 1997).

b. Mikronutrien

Mikronutrien esensial yang umum terdapat dalam medium kultur adalah Fe, Mn, Zn, B, Cu, Cl dan Mo. Setiap jenis medium umumnya mempunyai perbedaan perbandingan komponennya.

c. "Chelating agent"

"Chelating agent" adalah senyawa yang dapat mengikat ion logam dengan beberapa ikatan kimia dan membentuk cincin kompleks ("chelating"). EDTA (Ethylene Diamine Tetraacetic Acid) adalah "chelating" yang telah banyak digunakan dalam kultur jaringan tanaman. Kompleks Fe-EDTA telah banyak

memberikan pertumbuhan yang baik pada semua jenis kultur tanaman (Nitsch, 1969 dalam George and Sherrington, 1984).

d. Vitamin

Vitamin dibutuhkan oleh sel tanaman untuk membantu laju metabolisme. Vitamin yang sering digunakan dalam medium kultur *in vitro* adalah thiamin (vitamin B1), asam nikotinat, dan piridoksin (vitamin B6). Medium MS mengandung kombinasi vitamin yaitu thiamin, asam nikotinat, dan piridoksin, yang telah banyak mendukung kultur *in vitro* pada berbagai tanaman. Mioinositol merupakan gula alkohol, diberikan dalam medium sebagai suplemen (George and Sherrington, 1984).

e. Asam amino

Asam amino merupakan sumber N-organik yang berfungsi untuk pertumbuhan sel tanaman. Menurut Thom *et al.* (1981 dalam George dan Sherrington 1984) tersedianya asam amino akan lebih cepat diserap oleh eksplan daripada nitrogen yang diperoleh dari sumber lain dalam medium kultur. Menurut Gamborg (1981 dalam George dan Sherrington 1984) dalam medium kultur dengan komposisi garam anorganik yang tepat, penambahan campuran asam amino tidak memberikan pengaruh yang nyata. Asam amino glisin merupakan komponen tetap pada beberapa formulasi medium (White, 1939 dalam Gunawan, 1995).

f. Karbohidrat

Karbohidrat mempunyai dua fungsi utama dalam kultur *in vitro* yaitu sebagai sumber energi dan untuk keseimbangan tekanan osmotik dalam medium.

Sukrosa merupakan sumber energi yang paling sesuai untuk kultur *in vitro*. Gautheret (1945 dalam George dan Sherrington 1984) menggunakan kultur jaringan wortel, menemukan sukrosa sebagai sumber karbon paling baik. Kadar sukrosa 2 – 4% (w/v) dapat memberikan pertumbuhan kalus yang optimal (George dan Sherrington, 1984).

g. Agar

Agar hampir selalu digunakan sebagai “gelling agent”, untuk membuat media padat atau semi padat pada kultur *in vitro*. Beberapa keuntungan agar, antara lain:

1. Apabila dicampur air membentuk gel, yang mendidih pada suhu 100°C dan membeku pada suhu 45°C. Hal ini berarti agar stabil pada berbagai temperatur inkubasi.
2. Gel tidak didegradasi oleh enzim tanaman.
3. Agar tidak bereaksi dengan unsur-unsur dalam medium (George and Sherrington, 1984).

Konsentrasi agar yang diberikan berkisar antara 0,6 – 1%. Konsentrasi agar yang terlalu tinggi dapat mengurangi difusi persenyawaan dari dan ke arah eksplan, sehingga pengambilan unsur hara terhambat (Debergh 1982 dalam Gunawan 1997).

h. Zat pengatur tumbuh

Zat pengatur tumbuh merupakan komponen yang sangat diperlukan untuk pertumbuhan dan deferensiasi eksplan yang dikulturkan. Tanpa penambahan zat pengatur tumbuh dalam medium, pertumbuhan eksplan sangat terhambat bahkan

mungkin tidak akan tumbuh. Pembentukan kalus dan organ-organ tanaman pada kultur *in vitro* ditentukan oleh penggunaan yang tepat dari zat pengatur tumbuh tersebut. Setiap eksplan yang berasal dari organ dan spesies yang berbeda akan membutuhkan zat pengatur tumbuh yang berbeda pula (Hendaryono dan Wijayani, 1994; Narayanaswamy, 1994). Salah satu zat pengatur tumbuh yang dapat digunakan dalam kultur *in vitro* adalah auksin. Pemilihan jenis dan konsentrasi auksin tergantung dari: tujuan pengkulturan, kadar auksin endogen, kemampuan jaringan mensintesis auksin dan golongan zat pengatur tumbuh lain yang ditambahkan. Auksin alamiah adalah IAA (Indol Asetic Acid). Kadar auksin dalam eksplan tergantung dari bagian tanaman dan jenis tanaman yang dijadikan sumber eksplan. Peran fisiologis auksin dalam kultur kalus untuk mendorong pemanjangan dan pembesaran sel. Auksin yang sering digunakan untuk inisiasi pertumbuhan kalus adalah 2,4-D (2,4- Dichlorophenoxyacetic acid). Hormon 2,4-D merupakan auksin sintetik yang lebih stabil daripada IAA (George dan Sherrington, 1984; Wattimena, 1988).

i. Amonium nitrat

Amonium nitrat merupakan salah satu sumber nitrogen bagi tumbuhan. Apabila tanaman kekurangan nitrogen maka pertumbuhannya akan terhambat dan jaringan tanaman akan mati. Protein dan karbohidrat merupakan unit penyusun sel. Karbohidrat sebagian akan bergabung dengan asam lemak dan sebagian akan bergabung dengan asam amino yang terbentuk dari amonium membentuk membran sel (Truog, 1973; Agustina, 1990). Tumbuhan dalam medium kultur tidak dapat menambat N_2 , sehingga sumber nitrogen utamanya adalah NO_3^- dan

NH_4^+ . Apabila sumber nitrogen hanya diperoleh dari nitrat untuk sintesis asam amino maka nitrat tersebut tidak dapat langsung digunakan tetapi harus direduksi terlebih dahulu menjadi amonium di dalam sel tumbuhan. Asimilasi nitrat dalam tumbuhan tingkat tinggi dan alga terjadi dalam tiga tingkatan, yaitu: nitrat masuk ke dalam sel tumbuhan, reduksi nitrat menjadi nitrit, dan reduksi nitrit menjadi ammonia. Semua amonium pertama kali akan diubah menjadi gugus amina (Bray, 1983).

3. Lingkungan Tumbuh

Beberapa faktor yang mempengaruhi lingkungan kultur antara lain:

a. Suhu

Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa setiap jenis tanaman memiliki suhu optimum untuk pertumbuhan dan perkembangannya. Hampir semua kultur *in vitro* dipelihara dalam ruangan pada suhu yang sama antara siang dan malam. Penggunaan suhu konstan yang baik antara 20 – 28°C dan kisaran suhu yang sering digunakan pada kultur *in vitro* adalah 25 – 27°C (Street, 1977).

b. Kelembaban udara

Kelembaban relatif ruang kultur jaringan kurang lebih 70% (George and Sherrington, 1984). Kelembaban yang terlalu rendah penguapan air dari medium kultur akan menjadi sangat besar dan kelembaban yang terlalu tinggi akan menyebabkan pertumbuhan mikroorganisme dalam ruang kultur (Wetherell, 1982).

c. Cahaya

Cahaya diperlukan sebagai sumber energi untuk tanaman, namun dalam teknik *in vitro* cahaya tidak mutlak diperlukan dan biasanya digunakan lampu fluoresensi yang berwarna putih sebagai sumber cahaya tiruan. Lampu fluoresensi mempunyai kekuatan penyinaran 1000 – 4000 lux (Wetherell, 1982). Intensitas cahaya yang diperlukan untuk pertumbuhan kalus bervariasi tergantung varietas eksplan yang akan dikaluskan. Semua varietas akan terhambat pertumbuhannya pada penyinaran 10.000 lux.

2.3. Kultur kalus

Kalus adalah suatu jaringan hidup hasil dari pertumbuhan dan merupakan proliferasi massa jaringan yang belum berdeferensiasi serta terdiri dari massa sel yang tidak teratur. Massa sel ini terbentuk pada seluruh permukaan irisan eksplan, sehingga semakin luas permukaan irisan eksplan semakin cepat dan semakin banyak kalus yang terbentuk. Kemampuan jaringan membentuk kalus dan laju pertumbuhan kalus tergantung pada medium, zat pengatur tumbuh yang digunakan dan faktor lingkungan lainnya. Pembentukan kalus juga dipengaruhi oleh zat-zat tertentu dalam medium dan cara sterilisasi medium. Kultur kalus biasanya dipelihara dalam medium padat (Street, 1977; Wetherell, 1982; Hendaryono dan Wijayani, 1994). Pada tanaman dikotil yang termasuk dalam golongan herbaceous, kalus memiliki morfogenetik yang tinggi dapat diperoleh dari eksplan yang bervariasi seperti daun, potongan batang, akar, umbi pucuk, embrio benih dan kecambah (Gunawan, 1991). Meskipun pada prinsipnya semua jaringan tanaman dapat ditumbuhkan dalam medium kultur, namun sebaiknya dipilih

bagian tanaman yang bersifat meristematik (Hendaryono dan Wijayani, 1994). Medium dasar kultur *in vitro* antara lain medium MS, Nitsch dan Nitsch, White, Vacin dan Went, Knudson C, Schenk dan Hildebrant (SH) dan sebagainya, banyak digunakan untuk induksi kalus.

2.4. Pertumbuhan

Pertumbuhan merupakan konsep universal yang berkaitan dengan reaksi biokimia, peristiwa biofisik, dan proses fisiologi yang berinteraksi dalam tubuh tanaman dengan faktor luar. Pertumbuhan dapat didefinisikan sebagai penggandaan protoplasma yang merupakan komponen hidup sel. Jumlah sel merupakan suatu ukuran pertumbuhan dapat dijadikan sebagai parameter pertumbuhan. Pertumbuhan menurut Thimann (1960 dalam Sitompul dan Guritno, 1995) adalah penambahan ruang atau volume yang sifatnya “irreversible”. Pertumbuhan pada tumbuhan berlangsung terbatas pada beberapa bagian tertentu, yang terdiri dari sejumlah sel yang baru dihasilkan melalui proses pembelahan sel meristem. Pembelahan sel tidak menyebabkan penambahan ukuran, namun produk pembelahan sel itulah yang tumbuh dan menyebabkan pertumbuhan (Salisbury dan Ross, 1995).

Parameter pertumbuhan merupakan dasar penentuan dalam pengamatan pertumbuhan. Salah satu parameter pertumbuhan adalah biomassa tanaman yang ditentukan dengan mengukur berat basah atau berat segar dan berat kering tanaman (Sitompul dan Guritno, 1995). Pertumbuhan kalus dalam kultur *in vitro* dapat diukur dengan menimbang massa kalus (massa sel) yang terbentuk.