

PENGARUH *INDOLE-3-ACETIC ACID* (IAA) DAN *BENZYL AMINO PURINE* (BAP) TERHADAP INDUKSI DAN DETEKSI ALKALOID KALUS KAMILEN (*Matricaria chamomilla* L.)

Kezia Prashariska^{*}, Ari Pitoyo, Solichatun

Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sebelas Maret

^{*} Email: keziaprashariska@gmail.com

Info Artikel

Keywords:

BAP, callus, IAA, *Matricaria chamomilla* L., alkaloid

Kata kunci:

Matricaria chamomilla L., IAA, BAP, kalus, alkaloid

Abstract

The aim of this study was to determine the optimum concentration of IAA and BAP for the chamomile callus induction in media Murashige & Skoog (MS) and knowing the presence of alkaloids in the chamomile callus using histochemical methods. The research design was in the form of a Completely Randomized Design (CRD). The treatments were made into 9 combinations of IAA / BAP ratios respectively 1/3; 3/3; 5/3; 7/3; 1/5; 3/5; 5/5; 7/5 mg/L and the control treatment, each treatment carried out 3 times. Qualitative data in the form of color, callus texture and the presence of alkaloids while quantitative data consisted of callus induction time, fresh weight and dry weight of callus. Quantitative data were analyzed statistically with Analysis of Variance, if there were significant differences between treatments followed by Duncan's Multiple Range Test at the 5% test level. The various concentration ratios of IAA and BAP had an effect on induction callus. The best treatment was shown by IAA 5 mg/L and BAP 5 mg/L which were able to accelerate callus by 6-7 days, producing callus wet weight 0.401 g, callus dry weight 0.0319 g, callus morphology compact and intermediate. The results of the histochemical test showed an accumulation of alkaloids in the formed callus.

Abstrak

Penelitian ini mempunyai tujuan agar diketahui rasio konsentrasi Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) *Indole-3-Acetic Acid* (IAA) dan *Benzyl Amino Purine* (BAP) yang optimum untuk induksi kalus kamilen pada media *Murashige & Skoog* (MS) serta mengetahui adanya alkaloid pada kalus kamilen dengan metode histokimia. Dalam penelitian ini dipergunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Perlakuan penelitian ini meliputi 9 kombinasi yaitu meliputi rasio IAA/BAP berturut-turut 1/3; 3/3; 5/3; 7/3; 1/5; 3/5; 5/5; 7/5 mg/L dan perlakuan kontrol dengan setiap perlakuan dilakukan 3 kali ulangan. Data kualitatif berupa warna, tekstur kalus dan ada tidaknya alkaloid sedangkan data kuantitatif berupa waktu induksi kalus, berat segar serta berat kering kalus. Adapun data kuantitatif dilakukan analisis statistik melalui pengujian ANOVA, jika ditemukan perbedaan yang nyata antara suatu perlakuan kemudian diteruskan dengan pengujian DMRT bertaraf uji 5%. Hasil penelitian didapatkan yakni rasio konsentrasi IAA dan BAP yang bervariasi memberikan pengaruh terhadap induksi kalus. Perlakuan terbaik ditunjukkan oleh IAA 5 mg/L dan BAP 5 mg/L yang dapat mempercepat waktu munculnya kalus dengan waktu muncul 6-7 hari, menghasilkan berat basah kalus 0,401g, berat kering kalus 0,0319 g, morfologi kalus kompak dan intermediet. Hasil uji histokimia menunjukkan adanya akumulasi alkaloid pada kalus yang terbentuk.

PENDAHULUAN

Tanaman obat yang mempunyai berbagai manfaat salah satunya yaitu tanaman kamilen (*Matricaria chamomilla* L). Tanaman kamilen sering digunakan untuk mengobati demam, peradangan, maag, gangguan menstruasi dan gangguan pencernaan (Zadeh *et al.*, 2014). Bunga kamilen dapat dikeringkan untuk dijadikan teh herbal yang bermanfaat. Ekstrak tanaman kamilen dapat digunakan untuk menenangkan saraf dan mengatasi insomnia. Daun kamilen mengandung metabolit sekunder seperti tannin, flavonoid, terpenoid, steroid, dan alkaloid (Chauhan dan Aishwarya, 2018).

Alkaloid digolongkan basa organik yang kandungannya tersusun atas unsur nitrogen (N) secara umum asalnya dari suatu tanaman obat, dimana memiliki efek fisiologis yang kuat untuk manusia. Alkaloid berguna pada ranah farmakologi sebagai pemacu sistem saraf, meningkatkan tekanan darah, serta memberikan perlawanan terhadap infeksi mikrobial (Pasaribu, 2009). Metabolit sekunder berupa alkaloid dari kamilen bersifat antibakteri sehingga dapat dimanfaatkan menjadi bahan baku obat untuk infeksi kulit, gangguan pencernaan atau penyakit lainnya yang disebabkan bakteri patogen (Al-Maliki, 2012).

Saat ini, sebagian besar bibit kamilen diperbanyak dengan teknik konvensional secara generatif, teknik ini memerlukan waktu yang cukup lama sehingga sulit menjamin keberadaan bahan baku. Oleh karena itu kultur *in vitro* merupakan teknik alternatif untuk produksi metabolit sekunder dengan cepat tanpa harus membentuk tanaman dewasanya dan dapat diambil sewaktu waktu. Produksi metabolit sekunder menggunakan teknik kultur *in vitro* memiliki keuntungan dibandingkan dengan mengambil langsung dari alam, karena produksi metabolit sekunder dapat dimanipulasi dalam lingkungan yang terkendali. Pada metode kultur *in vitro* tanaman, senyawa metabolit sekunder bisa didapatkan melalui kultur kalus, kultur akar, kultur sel atau *suspense* sel (Purwaningrum, 2013).

Zat pengatur tumbuh (ZPT) dapat diberikan pada suatu media untuk mempercepat munculnya kalus. Terdapat beberapa zat pengatur tumbuh misalnya auksin, sitokinin, giberelin, dan etilen (Zulkarnain, 2009). Contoh auksin sintetik yaitu NAA (Naphthalene Acetic Acid), IBA (Indole Butiric Acid), IAA (Indole-3-Acetic Acid) serta 2,4-D (2,4- Dicholophenoxy Acetic Acid) sedangkan contoh sitokinin sintetik yaitu kinetin, BAP (Benzyl Amino Purine), dan zeatin (Dwiyani, 2015).

Auksin mempunyai pengaruh dalam pembesaran dan diferensiasi sel. Indole-3-Acetic Acid merupakan auksin utama yang ada pada tumbuhan. Sitokinin mempunyai pengaruh dalam pembelahan sel. Sitokinin yang sering digunakan yaitu BAP, karena sifat kestabilan BAP tidak mudah terurai oleh enzim yang diproduksi dari tumbuhan ataupun pemanasan pada sterilisasi suatu media (Indah dan Ermavitalini, 2013). Rasio ZPT berupa auksin dan sitokinin yang seimbang dapat mempengaruhi induksi kalus.

Pengujian histokimia digunakan untuk mengetahui beberapa kandungan metabolit sekunder dalam sel atau jaringan tumbuhan dengan kualitatif. Reagen khusus ditambahkan pada organ atau jaringan supaya menghasilkan warna yang spesifik sehingga dapat membuktikan keberadaan senyawa kimia tersebut (Maghfiroh, 2018). Deteksi alkaloid dapat menggunakan reagen Dragendorff dan reagen Wagner, ketika jaringan atau organ ditetesi reagen tersebut akan berwarna coklat kemerahan (Badria dan Aboelmaaty, 2019).

M. chamomilla termasuk spesies tanaman obat yang belum banyak dibudidayakan dengan teknik kultur *in vitro*. Mengingat potensi *M. chamomilla* yang besar untuk dipergunakan sebagai tanaman obat, maka perlu dilakukan penelitian kultur *in vitro* kamilen ini khususnya dalam hal induksi kalus serta produksi alkaloidnya. Pada penelitian ini dilakukan deteksi alkaloid pada kalus kamilen dengan metode histokimia. Kalus dapat dilihat secara mikroskopis dan dapat diketahui keberadaan suatu senyawa metabolit sekundernya secara spesifik dan lebih cepat dilakukan dengan metode histokimia

dibandingkan metode lain. Analisis histokimia kalus pada kultur kamilen belum banyak digunakan, maka dari itu akan dikaji dalam penelitian ini. Laporan penelitian terkait induksi kalus kamilen menggunakan zat pengatur tumbuh IAA dilakukan pengombinasian menggunakan BAP sejauh ini belum ditemukan. Berdasarkan latar belakang tersebut maka penelitian ini difokuskan agar diketahui pengaruh kombinasi IAA dan BAP terhadap induksi kalus kamilen (*M. chamomilla* L.) serta melakukan deteksi alkaloidnya dengan metode histokimia.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini berjalan mulai bulan September hingga Desember 2020 di Laboratorium Program Studi Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sebelas Maret. Alat yang dipakai pada penelitian diantaranya cawan petri, botol kultur, batang pengaduk, scalpel, laminar air flow (LAF), pinset, oven, autoklaf, neraca analitik, peralatan gelas, pipet tetes, hot plate, mikropipet, kertas pH, alumunium foil, shaker, plastik wrap, label, dan mikroskop. Bahan yang dipakai pada penelitian ini diantaranya daun kamilen (*Matricaria chamomilla* L.) sebagai eksplan yang ditanam pada media MS. Tanaman kamilen (*Matricaria chamomilla* L.) diperoleh dari Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) Tawangmangu Kabupaten Karanganyar. Adapun bahan untuk sterilisasi daun kamilen adalah deterjen dan akuades steril, larutan bakterisida, larutan fungisida, dan larutan bayclin (Natrium hipoklorid/NaClO) serta alkohol. Bahan media yang dipergunakan yaitu media MS instan, agar, sukrosa, akuades, KOH dan HCl. ZPT yang dipakai yakni IAA dan BAP. Bahan untuk deteksi alkaloid yaitu reagen Dragendorff dan reagen Wagner.

Pada penelitian ini digunakan RAL 1 faktor. Faktor perlakuan dari penelitian ini yakni menambahkan IAA dan BAP. Penelitian ini terdiri dari 9 perlakuan yang setiap perlakuannya dilaksanakan 3 pengulangan dengan demikian didapatkan 27 satuan percobaan. Data yang diperoleh selanjutnya dilakukan analisis kualitatif serta kuantitatif. Data kualitatif didapatkan dari observasi warna, tekstur kalus, serta uji alkaloid yang dilakukan analisis secara deskriptif sementara data kuantitatif diperoleh dari waktu induksi kalus, berat segar serta berat kering kalus. Analisis data dilakukan secara statistik menggunakan ragam (ANOVA), jika ditemukan perbedaan yang nyata di antara perlakuan maka dilanjutkan dengan pengujian Duncan's Multiple Range Test (DMRT) pada taraf uji 5%. Pengamatan yang dilakukan antara lain :

1. Pengamatan Waktu Terbentuknya Kalus

Waktu terbentuknya kalus dihitung setelah 1 hari eksplan ditanam hingga ekplan tersebut muncul kalus. Pengamatan dilakukan setiap hari hingga kalus terbentuk

2. Pengamatan Morfologi Kalus

Kalus diamati secara visual dilihat dari warna serta tekstur kalus yang dihasilkan dari eksplan. Pengamatan dilakukan setiap satu minggu sekali di hari yang sama.

3. Penentuan Berat Segar serta Berat Kering Kalus

Kalus yang dihasilkan setelah 5 minggu penanaman diambil dan ditimbang dengan neraca. Kalus dikeringkan dengan oven dengan suhu 60°C kemudian ditimbang berat kering kalus tersebut ketika kalus sudah tidak mengalami penurunan berat.

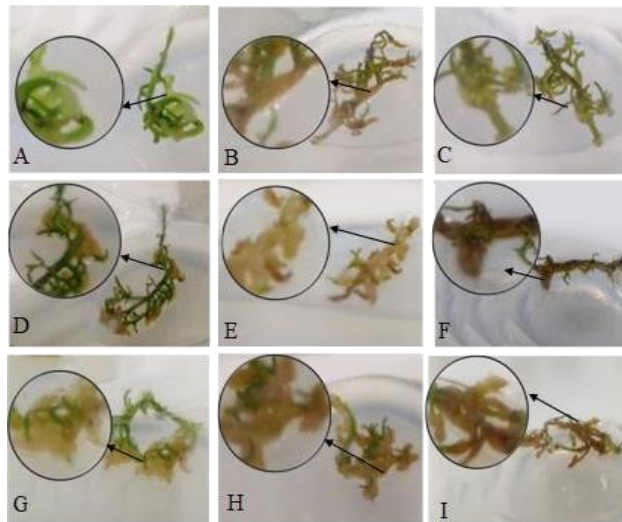
4. Pengamatan Histokimia Alkaloid

Perubahan warna diamati yang terjadi dan divisualisasi dengan mikroskop (Badria dan Aboelmaaty, 2019). Pengukuran warna menggunakan *Munsell Color Chart*.

HASIL PEMBAHASAN

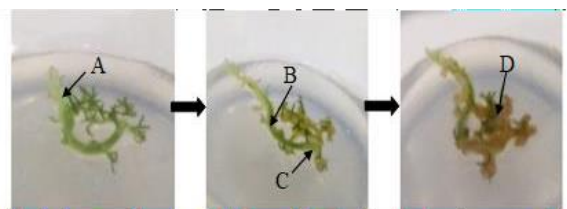
A. Pengaruh Kombinasi Konsentrasi IAA dan BAP Terhadap Waktu Muncul Kalus Kamilen (*Matricaria chamomilla* L.)

Munculnya kalus pada eksplan daun kamilen merupakan salah satu tanda dari perkembangan tanaman. Kombinasi IAA dan BAP dengan konsentrasi yang berbeda diberikan ke dalam media Murashige & Skoog untuk menginduksi pembentukan kalus kamilen. Gambar 1 menunjukkan bahwa semua perlakuan berhasil menginduksi pembentukan kalus.



Gambar 1. Kalus pada eksplan kamilen pada 3 minggu setelah kultur. Keterangan: (A-I) rasio IAA/BAP berturut-turut 0/0; 1/3; 3/3; 5/3; 7/3; 1/5; 3/5; 5/5; 7/5 mg/L. Bagian perbesaran yang ditunjuk tanda panah merupakan kalus.

Semua eksplan kamilen yang ditanam memunculkan kalus. Inisiasi pembentukan kalus diawali dengan didapatinya penebalan eksplan dan perubahan warna eksplan yang terletak di luka bekas pemotongan. Gambar 2 menunjukkan pembentukan kalus dari yang mulanya berupa pembengkakan jaringan eksplan kemudian diikuti menggulungnya eksplan, perubahan warna dan munculnya kalus.



Gambar 2. A.Penebalan Eksplan; B.Perubahan Warna; C.Menggulungnya daun ; D.Kalus Muncul

Penebalan eksplan merupakan tanda adanya aktivitas proliferasi atau pembelahan berulang-ulang dari sel-sel parenkim. Pembelahan sel tersebut menyebabkan volume sel bertambah dan dari morfologi luar nampak membengkak. Nutrisi dan hara pada media menginduksi atau menginisiasi pembelahan sel tersebut ditandai dengan membengkaknya jaringan yang ada pada daerah tersebut.

Hasil penelitian ini menunjukkan perubahan warna eksplan dari hijau menjadi putih kehijauan dan putih kekuningan (Gambar 2). Perubahan warna merupakan respon eksplan yang menunjukkan adanya perkembangan. Perubahan warna pada eksplan menunjukkan adanya kandungan metabolit sekunder ataupun akumulasi fenol (George dan Sherrington, 1984).

Berdasar pengamatan yang dilakukan jaringan kalus kamilen pada semua perlakuan muncul dari area eksplan yang bersentuhan langsung dengan media. Kalus muncul dimulai dari daerah yang mengalami luka bekas pemotongan. Kalus berfungsi untuk melindungi diri dari infeksi patogen dan mencegah kehilangan air. Tabel 1 menunjukkan bahwa semua perlakuan menunjukkan pembentukan kalus dengan waktu kemunculan yang bervariasi.

Tabel 1. Rerata waktu muncul, berat basah dan berat kering kalus kamilen pada variasi konsentrasi IAA dan BAP

Kode	Rerata waktu muncul kalus (hari)	Rerata berat basah kalus (mg)	Rerata berat kering kalus (mg)
I0B0	17,33 ± 0.58 ^f	74 ± 8.7 ^a	6.9 ± 1.3 ^a
I1B3	8,00 ± 0.00 ^{bcd}	226 ± 42.3 ^b	14.4 ± 3.8 ^{ab}
I3B3	7,67 ± 0.58 ^{abc}	276 ± 36.8 ^{bc}	21.1 ± 1.2 ^{bc}
I5B3	9,33 ± 0.58 ^e	194 ± 21.0 ^b	11.6 ± 0.9 ^a
I7B3	9,00 ± 0.00 ^{de}	207 ± 62.7 ^b	13.5 ± 4.2 ^{ab}
I1B5	7,00 ± 1.00 ^{ab}	391 ± 73.6 ^d	27.6 ± 6.6 ^{cd}
I3B5	7,33 ± 0.58 ^{abc}	361 ± 98.6 ^{cd}	30.2 ± 10.2 ^{cd}
I5B5	6,67 ± 0.58 ^a	407 ± 35.4 ^d	31.9 ± 6.8 ^d
I7B5	8,33 ± 0.00 ^{cde}	183 ± 57.7 ^b	13.1 ± 4.5 ^{ab}

Keterangan: rasio IAA/BAP berturut-turut 0/0; 1/3; 3/3; 5/3; 7/3; 1/5; 3/5; 5/5; 7/5 mg/L. Angka rerata dalam kolom sama yang diikuti simbol huruf yang sama tidak berbeda nyata, sedangkan angka rerata dalam kolom sama yang diikuti simbol huruf yang berbeda mengindikasikan perbedaan nyata sesuai dengan pengujian DMRT 5%.

Semua perlakuan pemberian IAA dan BAP berhasil mempercepat waktu kemunculan kalus (Tabel 1). Pemberian IAA dan BAP dengan konsentrasi yang bervariasi menunjukkan rata-rata hasil perbedaan yang signifikan antar perlakuan. Pemberian IAA dan BAP dibutuhkan dalam memacu pembentukan kalus dan membuktikan bahwa komposisi IAA dan BAP mempengaruhi waktu induksi kalus kamilen.

Rasio konsentrasi IAA dan BAP yang seimbang menginduksi kalus kamilen lebih cepat dibandingkan rasio konsentrasi yang lain (Tabel 1). IAA 5 mg/L dan BAP 5 mg/L termasuk pengkombinasian hormon auksin dengan sitokinin eksogen yang optimum untuk mempercepat waktu kemunculan kalus kamilen. Hal ini diduga karena tercapainya keseimbangan yang tepat dengan hormon endogen eksplan daun kamilen untuk memacu pembelahan sel terus menerus untuk pembentukan kalus. Pemberian auksin dan sitokinin efektif untuk memacu inisiasi kalus kamilen. Efektifitas penambahan auksin dan sitokinin eksogen dalam memacu inisiasi kalus juga dilaporkan Zuraidassanaaz (2016), pada kultur in vitro sirih hitam (*Piper betle* L). Dalam penelitian tersebut, perlakuan tanpa penambahan hormon eksogen menunjukkan rata-rata kemunculan kalus lebih lama. Penambahan rasio konsentrasi IAA dan BAP yang seimbang pada penelitian ini menginduksi kalus lebih cepat, hal ini juga dilaporkan dalam penelitian Sayadi *et al.*, (2014), yang melakukan penelitian serupa menggunakan hormon eksogen jenis lain. Dalam penelitian tersebut konsentrasi zat pengatur tumbuh NAA 1 mg/L dan kinetin 1 mg/L pada kamilen menginduksi kalus lebih cepat daripada konsentrasi lain. Perlakuan IAA 5 mg/L beserta BAP 5 mg/L pada penelitian ini juga sejalan dengan riset Dewi *et al.*, (2012), yaitu didapatkan konsentrasi zat pengatur tumbuh IAA 5 mg/L dan BAP 5 mg/L mampu melakukan penginduksian kalus lebih cepat pada tanaman *Aglaonema* sp. Var. Lipstik.

Zat pengatur tumbuh auksin serta sitokinin yang diberikan dengan konsentrasi seimbang mampu menginisiasi adanya pembelahan sel serta mengoptimalkan pertumbuhan selnya. Menurut Hayati dkk (2010) auksin akan menginisiasi pemanjangan sel dengan mempengaruhi fleksibilitas dinding sel serta menjadi pemacu suatu protein yang terdapat pada membran plasma supaya melakukan pemompaan ion H⁺ menuju dinding sel. Ion H⁺ mengaktivasi suatu enzim selanjutnya melakukan pemutusan ikatan silang hidrogen rantai molekul selulosa yang menyusun dinding selnya. Menginisiasi Sel tumbuh memanjang dikarenakan air yang masuk dengan cara osmosis. Sel akan tumbuh dengan melakukan sintesis kembali mineral dinding sel serta sitoplasma. Kamsinah *et al.*, (2009), menyatakan bahwa sitokinin berperan pada pembelahan sel yaitu melakukan percepatan transisi dari fase G1 (Gap

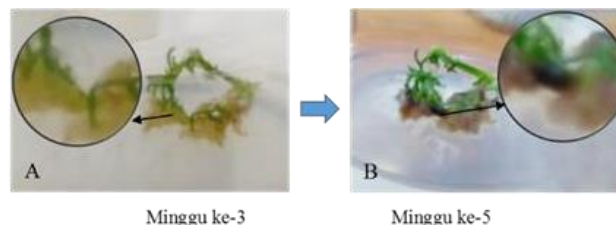
1) ke S (Synthesis) serta transisi dari fase G2 (Gap 2) ke M (Mitosis) pada suatu siklus sel. George (1993), menyebutkan bahwa G1 merupakan fase meningkatnya kuantitas organela serta volume sitoplasma, sesudah fase G1 siap selanjutnya sel akan masuk pada fase S. Fase S ialah fase dimana terjadi sintesa DNA dengan dihasilkannya replikasi DNA yang identik menggunakan DNA induk. Fase S diikuti dengan fase G2 kemudian sel bersiap melakukan mitosisnya, sementara fase M yaitu fase mitosis dimana terjadinya suatu pembelahan inti.

B. Pengaruh Kombinasi Konsentrasi IAA dan BAP Terhadap Morfologi Kalus Kamilen (*Matricaria chamomilla* L.)

Rasio konsentrasi IAA dan BAP yang bervariasi mempengaruhi munculnya morfologi kalus kamilen yang beragam. Respon yang beragam tersebut tampak secara visual berupa warna serta tekstur kalus. Berdasarkan pengamatan, kalus kamilen rata-rata muncul di minggu kedua maupun ketiga. Kalus tersebut muncul di ujung dan tepi eksplan.

Rata-rata kalus yang muncul warnanya putih kehijauan, putih kekuningan serta putih kecoklatan dan coklat, sementara tekstur kalus yang didapatkan yaitu kompak serta remah. Warna kalus yang berbeda tersebut mengindikasikan tingkatan pada perkembangan kalus yang bervariasi. Warna putih menandakan plastida belum terdiferensiasi dan mencirikan kondisi meristematis (Fatmawati, 2008). Warna hijau menandakan sel menuju kedewasaan, dengan membentuk kloroplas (Robbiani, 2010). Warna kuning diduga karena adanya senyawa metabolit sekunder pada kalus (Evans, 2003). Warna coklat diduga karena adanya aktivitas metabolik sehingga menghasilkan fenol dan fenol tersebut mengalami oksidasi. Fenol yang berlebihan dapat bersifat toksik bagi sel sehingga dapat mengganggu pertumbuhan kalus dan dapat mengakibatkan kematian sel (Hayati dkk., 2010).

Berdasarkan pengamatan, perlakuan penambahan IAA dan BAP menunjukkan bahwa kalus yang muncul menampilkan warna putih kehijauan dan putih kekuningan lebih lama (sekitar 2 minggu) daripada perlakuan tanpa penambahan hormon eksogen yang lebih cepat berubah menjadi coklat. Keberadaan auksin dan sitokinin diduga dapat menunda penuaan sel (Sitinjak *et al.*, 2015). Perubahan warna kalus kamilen dapat dicermati dalam Gambar 3.



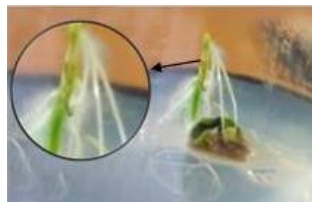
Gambar 3. Perubahan warna kalus kamilen (perlakuan IAA 3 mg/L+BAP 3 mg/L). Keterangan: A. Kalus Putih Kekuningan B. Kalus Coklat

Rata-rata semua perlakuan menghasilkan tekstur kalus yang kompak remah atau intermediet. Tekstur kalus kompak mempunyai karakteristik tidak mudah dipisahkan serta berbentuk gumpalan padat. Kalus intermediet termasuk kalus dengan teksturnya yang sebagian kompak serta bagian lain remah. Tekstur kalus friable atau remah tergolong tekstur kalus yang memiliki sel-sel kalus terpisah-pisah sehingga kalus ini dapat mudah dipisahkan. Pembelahan sel dari kalus friable lebih cepat daripada kalus kompak.



Gambar 4. Tekstur kalus kamilen. Keterangan: a. Tekstur kompak perlakuan IAA 5 mg/L+BAP 5 mg/L
b. Tekstur intermediet perlakuan IAA 7 mg/L+BAP 3 mg/L

Tekstur kalus beragam mulai dari kompak sampai dengan remah tergantung dengan jenis eksplan, komposisi nutrisi media, umur kalus, zat pengatur tumbuh, serta keadaan pertumbuhan. Kalus bertekstur kompak mengandung metabolit sekunder lebih tinggi dibandingkan dengan kalus friable atau intermediet (Indah dan Ermavitalini, 2013). Gambar 4a menunjukkan kalus berasal dari perlakuan IAA 5 mg/L serta BAP 5 mg/L yang memiliki tekstur kalus kompak, sedangkan Gambar 4b menunjukkan kalus dari perlakuan IAA 7 mg/L BAP 3 mg/L yang memiliki tekstur intermediet. Hal ini disebabkan rasio konsentrasi IAA dan BAP yang seimbang dapat menghasilkan tekstur kalus kompak yang nantinya dapat menghasilkan metabolit sekunder lebih tinggi dibandingkan rasio yang lain.



Gambar 5. Organogenesis eksplan kamilen. Keterangan: perlakuan IAA 0 mg/L+BAP 0 mg/L
Terdapat 2 jenis organogenesis yakni organogenesis langsung serta tidak langsung.

Organogenesis langsung tampak pada eksplan yang ditanamkan secara langsung bergenerasi kemudian terbentuknya suatu tunas atau akar yang muncul bukan melalui kalus, sedangkan organogenesis tidak langsung tunas atau akar muncul dari kalus yang dihasilkan eksplan (Suminar dkk., 2017). Pada penelitian ini dijumpai organogenesis langsung dari eksplan kamilen yang ditanam dalam perlakuan IAA 0 mg/L serta BAP 0 mg/L atau perlakuan yang tidak diberi penambahan hormon eksogen pada minggu kelima (Gambar 5). Hal ini menunjukkan bahwa adanya kemungkinan kandungan auksin endogen pada eksplan kamilen cukup tinggi sehingga morfogenesis mengarah bukan pada pembentukan kalus tetapi lebih mengarah ke pembentukan akar (Massa, 2016).

C. Pengaruh Kombinasi Konsentrasi IAA dan BAP Terhadap Berat Basah dan Berat Kering Kalus Kamilen (*Matricaria chamomilla* L.)

Pertumbuhan kalus didapatkan dengan menimbang berat basah dan berat kering kalus. Berat basah dan berat kering kalus kamilen semua perlakuan dan ulangan ditimbang saat kalus sudah diinkubasi selama 5 minggu pada hari terakhir pengamatan. Kalus diambil dari media dan ditimbang menggunakan neraca analitik. Rata-rata berat basah dan berat kering kalus kamilen bisa dicermati dalam Tabel 1.

Berdasarkan Tabel 1, tampak perlakuan tanpa penambahan hormon eksogen menghasilkan total berat basah dan kering lebih rendah daripada media dengan penambahan hormon eksogen. Rasio seimbang antara IAA 5 mg/L dengan BAP 5 mg/L mencapai nilai tertinggi untuk berat basah dan berat kering kalus. Hal ini menunjukkan bahwa hormon eksogen sangat dibutuhkan dalam memacu pembentukan kalus dan komposisi hormon eksogen tersebut juga mempunyai pengaruh pada berat basah dan berat kering kalus kamilen yang dihasilkan.

Berdasarkan Tabel 1 dengan konsentrasi IAA 5 mg/L dan BAP 5 mg/L dihasilkan nilai rata-rata berat basah dan berat kering kalus lebih tinggi dibandingkan perlakuan lain. Pada penelitian Junairiah (2019)

ditemukan yakni adanya perlakuan konsentrasi IBA 2,0 mg/L serta BAP 2,0 mg/L dapat menghasilkan suatu nilai rata-rata berat segar serta berat kering kalus yang paling baik, yakni 0,8507 gram dan rata-rata berat kering 0,0769 gram. Demikian mengindikasikan bahwa rasio konsentrasi yang seimbang dan yang lebih tinggi mampu menginduksi berat basah dan berat kering kalus kamilen lebih optimal. Seperti ditunjukkan penelitian lain pada tanaman anggur (*Vitis vinifera* L.) didapatkan yakni semakin tinggi pemberian hormon 2,4-D maka juga semakin tinggi persentase eksplan yang mampu menghasilkan kalus (Dewi *et al.*, 2012).

Auksin dan sitokinin yang seimbang berpengaruh terhadap pertumbuhan kalus. Pertumbuhan kalus berhubungan dengan kemampuan sel-sel dalam membelah dan membesarnya kalus karena meningkatnya jumlah maupun ukuran sel. Kalus merupakan hasil dari pembelahan sel yang tidak terkendali. Pertumbuhan kalus dapat dipacu dengan pemberian zat pengatur tumbuh, tanpa adanya penambahan zat pengatur tumbuh maka pertumbuhan kalus akan sangat lama dan kalus yang dihasilkan sedikit seperti dalam perlakuan IAA 0 mg/L dan BAP 0 mg/L.

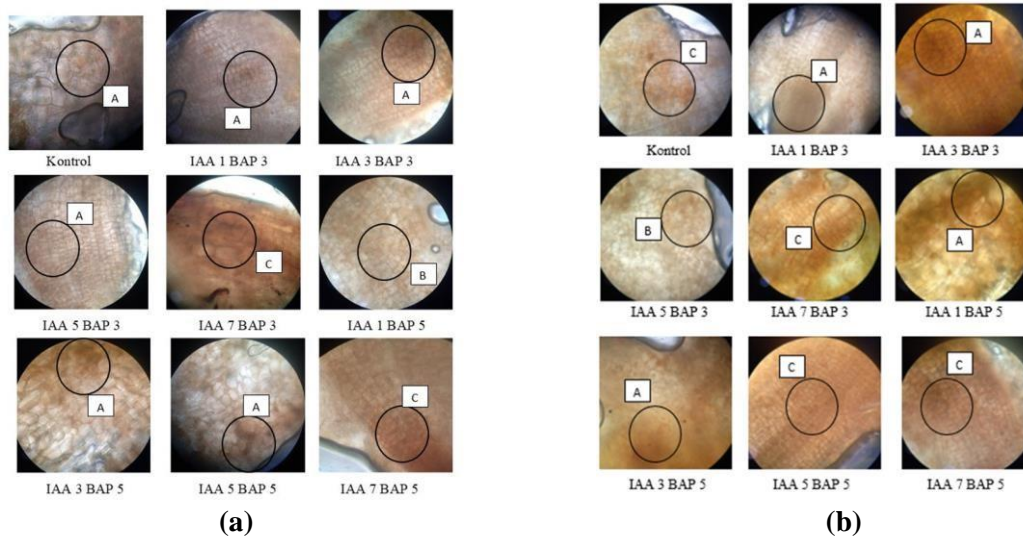
Perbedaan laju pertumbuhan kalus dipengaruhi oleh adanya kemampuan jaringan dalam melakukan penyerapan berbagai zat hara yang ada. Santoso dan Nursandi (2004) memaparkan bahwa induksi kalus terpengaruh pada rangsangan secara hormonal, yaitu auksin serta sitokinin. Auksin dan sitokinin termasuk hormon yang tepat untuk melakukan induksi pada kalus, serta memberikan rangsangan pada pertumbuhan sel secara cepat. Diberikannya kombinasi dari konsentrasi zat pengatur tumbuh dalam media dapat menciptakan keseimbangan konsentrasi diantara auksin eksogen dengan sitokinin endogen yang terdapat pada eksplan (Massa, 2016). Hayati dkk (2010), menyatakan bahwa auksin menginisiasi pemanjangan sel dengan memberikan pengaruh fleksibilitas ke dinding sel. Sel tumbuh secara memanjang diakibatkan oleh air yang masuk melalui osmosis. Sel terus tumbuh dengan melakukan sintesis kembali mineral dinding sel dan sitoplasma.

Peningkatan berat basah kalus sebagai hasil dari elongasi dan pembesaran sel (Wattimena, 1991). Auksin dan sitokinin bekerja dengan sinergis mempengaruhi osmosis air, pembesaran sel dan pembelahan sel. Semakin optimum pemberian auksin dan sitokinin maka akan menghasilkan berat basah kalus yang tinggi, hal ini dikarenakan meningkatnya kemampuan kalus dalam penyerapan air. Pada penelitian ini berat basah dan berat kering kalus didapatkan suatu respon yang tidak jauh hasilnya, hanya dalam perlakuan IAA 1 mg/L dan BAP 5 mg/L yang mengindikasikan adanya penurunan berat kering. Hal tersebut diduga kalus menyimpan air yang cukup banyak sehingga ketika kondisi kering berat kalus jadi lebih rendah. Pengukuran berat kering kalus dilakukan untuk mendapatkan berat kalus dalam kondisi konstan.

D. Deteksi Alkaloid Pada Kalus Kamilen Dengan Metode Histokimia

Kalus yang didapatkan dari eksplan kamilen yang telah dikulturkan selama lima minggu diuji senyawa metabolit sekundernya. Metabolit sekunder yang terdapat pada kamilen salah satunya yaitu alkaloid. Pada penelitian ini dilakukan uji pewarnaan histokimia pada kalus kamilen untuk mengetahui apakah terdapat senyawa alkaloid pada kalusnya.

Uji pewarnaan histokimia ialah suatu metode agar diketahui kandungan senyawa kimia dalam jaringan tanaman dengan kualitatif. Uji bisa dilaksanakan melalui cara yakni memberikan penambahan reagen ataupun larutan khusus dalam sayatan kalus serta akan dihasilkan suatu warna spesifik (Maghfiroh dkk., 2018). Gambar 6a dan Gambar 6b merupakan hasil uji pewarnaan histokimia menggunakan reagen Wagner dan Dragendorff untuk mengetahui alkaloid pada kalus kamilen menggunakan mikroskop dengan perbesaran 40.



Gambar 6. (a) Hasil uji histokimia alkaloid pada kalus daun kamilen menggunakan reagen Wagner (b) Hasil uji histokimia alkaloid pada kalus daun kamilen menggunakan reagen Dragendorff. Keterangan: Lingkaran: A. Warna coklat B. Warna coklat muda C. Warna coklat kemerahan

Berdasar Gambar 6a diketahui bahwa kalus dari semua perlakuan menunjukkan hasil uji yang positif mengandung alkaloid. Hasil uji histokimia dengan reagen Wagner yang positif alkaloid tampak berwarna coklat hingga coklat kemerahan pada anatomi kalus kamilen. Hasil menunjukkan bahwa perlakuan dengan penambahan IAA dan BAP menampakkan warna coklat semakin pekat. Berdasar Gambar 6b diketahui bahwa kalus dari semua perlakuan menunjukkan hasil uji yang positif mengandung alkaloid. Hasil uji histokimia menggunakan reagen Dragendorff yang positif alkaloid ditunjukkan dengan warna coklat hingga coklat kemerahan pada anatomi kalus kamilen. Berdasar Tabel 2, Rentang warna yang didapat dari kode *Hue Munsell Chart* yaitu diantaranya *yellow red, red dan red purple*, hal ini menunjukkan bahwa warna yang dihasilkan kecoklatan. Hasil menunjukkan bahwa perlakuan dengan penambahan IAA dan BAP menampakkan warna coklat semakin pekat.

Tabel 2. *Munsell value* dari hasil uji histokimia kalus kamilen dengan reagen Wagner dan Dragendorff

Nama Perlakuan	<i>Munsell value</i> (reagen Wagner)	Warna	<i>Munsell value</i> (reagen Dragendorff)	Warna
Kontrol	5YR 4/2	Coklat	5YR 4/3	Coklat muda
IAA1 BAP 3	5YR 6/2	Coklat	5YR 3/3	Coklat
IAA 3 BAP 3	5YR 4/2	Coklat	5YR 4/6	Coklat
IAA 5 BAP 3	5YR 5/2	Coklat	7.5R 5/6	Coklat kemerahan
IAA 7 BAP 3	10R 4/4	Coklat kemerahan	5YR 3/4	Coklat kemerahan
IAA 1 BAP 5	5YR 6/4	Coklat muda	5YR 4/4	Coklat
IAA 3 BAP 5	5YR 5/3	Coklat	5 YR 2/2	Coklat
IAA 5 BAP 5	5YR 4/3	Coklat	5YR 3/3	Coklat kemerahan
IAA 7 BAP 5	5YR 4/3	Coklat kemerahan	10R 6/4	Coklat kemerahan

Pengamatan anatomi mikroskopis kalus kompak kamilen dipotong secara melintang dan terlihat susunan dinding sel yang rapat. Pada hasil uji histokimia ini menunjukkan hasil bahwa terdapat kandungan alkaloid pada kalus kamilen baik pada uji Wagner maupun Dragendorf. Kalus kompak yang digunakan tersebut biasanya mengandung banyak metabolit sekunder karena tersusun atas struktur yang padat serta didalamnya terkandung banyak air.

Salah satu faktor yang dapat mempengaruhi adanya kandungan alkaloid pada kalus yaitu umur fisiologis kultur. Kandungan alkaloid dalam kalus juga dapat ditingkatkan melalui optimasi medium. Penambahan nutrisi serta zat pengatur tumbuh ke suatu media mampu meningkatkan metabolisme alkaloid. Pada jalur biosintesis, alkaloid dapat disintesis melalui jalur asam shikimat, asam asetat-malonat dan asam mevalonat. Metabolit sekunder tersebut didapatkan dari proses glikolisis, siklus Krebs sebagai tahapan menghasilkan energi dan asam amino sebagai prekursor (Julianto, 2019). Prekursorialah molekul yang dipergunakan oleh enzim biosintetik untuk substrat serta diubah menjadi produk tertentu. Hormon yang ditambahkan dapat mempengaruhi proses fisiologis eksplan karena berpengaruh terhadap sintesis protein dan pengaturan aktivitas enzim. Sebagian besar alkaloid terbentuk dari banyaknya asam amino, salah satunya yaitu triptofan. IAA secara struktural terkait dengan asam amino triptofan. Proses ini dapat meningkatkan pertumbuhan, selanjutnya dapat meningkatkan biosintesis metabolit sekunder.

KESIMPULAN

Penambahan IAA dan BAP berpengaruh mempercepat waktu muncul kalus dan meningkatkan pertumbuhan kalus kamilen (*Matricaria chamomilla* L.). Konsentrasi IAA 5 mg/L serta BAP 5 mg/L menghasilkan kalus kamilen paling tinggi dibandingkan perlakuan lain dengan rerata waktu muncul kalus yakni 6-7 hari, berat basah kalus 0,401 gram, berat kering kalus 0,0319 gram, morfologi kalus kompak dan intermediet. Terdapat alkaloid pada kalus kamilen dengan penambahan IAA dan BAP.

DAFTAR PUSTAKA

- Al-Maliki, A. D. M. 2012. Isolation and Identification of Phenols and an Alkaloidic Compound from *Matricaria chamomilla* Plant Flowers and Study of Their Medicinal Activity Against the Pathogenic Bacteria of Skin Infections. *Iraq Academic Scientific Journal*. 7(3): 1-17
- Badria, F. A & Aboelmaaty, W.S. 2019. Plant Histochemistry: A Versatile and Indispensable Tool in Localization of Gene Expression, Enzymes, Cytokines, Secondary Metabolites and Detection of Plants Infection and Pollution. *Acta Scientific Pharmaceutical Sciences*. 3(7): 88-100
- Chauhan, E. S & Aishwarya, J. 2018. Nutraceutical Analysis of *Matricaria recutita* (Chamomile) Dried Leaves and Flower Powder and Comparison between Them. *International Journal of Phytomedicine*. 10(2): 111-114
- Dewi, I., Wahyuni, D. dan Purnobasuki, H. 2012. Perkembangan Kultur Daun *Aglaonema* sp. var Siam Pearl, *Aglaonema* sp. var. Lady Valentin dan *Aglaonema* sp. var. Lipstik Dengan Perlakuan Zat Pengatur Tumbuh IAA dan BAP. *Berkala Penelitian Hayati*. 17(2): 197-203
- Dwiyani, R. 2015. *Kultur Jaringan Tanaman*. Denpasar: Pelawa Sari.
- Evans, D. E., Coleman, J. O. D., Kearns, A. 2003. *Plant Cell Culture*. New York: Bios Scientific.
- Fatmawati, A. 2008. Kajian Konsentrasi BAP dan 2,4-D terhadap Induksi Kalus Tanaman *Artemisia annua* L. secara In Vitro. *Skripsi Fakultas Pertanian UNS*. Surakarta.
- George, E.F and Sherrington, P.D. 1984. *Plant Propagation by Tissue Culture*. England: Exegetics Limited.
- George EF. 1993. *Plant Propagation by Tissue Culture*. England: Exegetic Ltd

- Hayati, S. K., Y. Nurchayati dan N. Setiari. 2010. Induksi Kalus dari Hipokotil Alfalfa (*medicago sativa* L.) secara in vitro dengan Penambahan Benzyl Amino Purine (BAP) dan α -Naphthalene Acetic Acid (NAA). *BIOMA* 12(1) : 6-12
- Indah, P. N. dan Ermavitalini, D. 2013. Induksi Kalus Daun Nyamplung (*Calophylluminophyllum* Linn.) pada Beberapa Kombinasi Konsentrasi 6-Benzylaminopurine (BAP) dan 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D). *Jurnal Sains Dan Seni Pomits*. 2(1): 2337-3520.
- Julianto TS. 2019. *Fitokimia Tinjauan Metabolit Sekunder dan Skrining Fitokima*. Yogyakarta: Universitas Islam Indonesia.
- Junairiah, A., Rachmah, Y. S. W Manuhara, N. L., Sulistyorini dan Surahmaida. 2019. Pengaruh Hormon Indole Butyric Acid (IBA) dan 6-Benzyl Amino Purin (BAP) terhadap Induksi Kalus *Piper betle* L. var Nigra. *Journal of Pharmacy and Science* 4(2): 85-90
- Kamsinah, K. T., Hardiyati, S., Sugiyono . 2009. Pengaruh Pemberian Sitokinin Terhadap Pertumbuhan Palea dan Lemma Padi Melalui Kultur In Vitro. *BIOSFERA* 26 (2) : 77-84
- Maghfiroh, L., Tintrim, R. dan Ari, H. 2018. Profil Histokimia dan Analisis *In Silico* Senyawa Metabolit Sekunder pada Daun Zaitun (*Olea europaea* L.). *e-Jurnal Ilmiah SAINS ALAMI (Known Nature)*. 1(1): 74 - 86
- Massa, G. N. O. 2016. Pengaruh Variasi Konsentrasi Zat Pengatur Tumbuh *Dichlorophenoxyacetic Acid* (2,4 D) dan *Benzyl Adenine* (BA) Terhadap Induksi dan Kandungan Senyawa Metabolit Sekunder Kalus Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz dan Pav.). Skripsi. Universitas Airlangga. Surabaya
- Pasaribu, S. 2009. Uji Bioaktivitas Metabolit Sekunder Dari Daun Tumbuhan Bandotan. *Jurnal Kimia Mulawarman* 6 (2): 23-29.
- Purwaningrum, Y. 2013. Kultur Kalus Sebagai Penghasil Metabolit Sekunder Berupa Pigmen. *GRILAND* 2(2) :117-127
- Robbiani, D. 2010. *Pengaruh Kombinasi Naphthalene Acetic Acid (NAA) dan Kinetin pada Kultur In Vitro Eksplan Daun Tembakau (Nicotiana tabacum L. Var. Prancak 95)*. Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya.
- Santoso, U dan Nursandi, F. 2004. *Kultur Jaringan Tanaman*. Malang: UMM Press.
- Sayadi, V., A. A. Mehrabi., M. Saidi., and K. Nourollahi. 2014. In vitro culture and callus induction of chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) explants under different concentrations of plant growth regulators. *International Journal of Biosciences*. 4(10): 206-211
- Sitinjak, M. A., M. Isda., S. Fatonah. 2015. Induksi Kalus Dari Eksplan Daun *In Vitro* Keladi Tikus (*Typhonium* sp.) Dengan Perlakuan 2,4-D Dan Kinetin. *Al-Kaunyah Jurnal Biologi* 8(1):32-39
- Suminar, E. S., Sumadi. S., Mubarak. T., Sunarto dan N. S. E, Rini. 2017. Percepatan Penyediaan Benih Sumber Kedelai Unggul Secara In Vitro. *Jurnal Agrikultura* 28 (3): 126-135
- Wattimena. 1991. *Zat Pengatur Tumbuh Tanaman*. Bogor: PAU IPB.
- Zadeh, J. B., N. M. Kor and Z. M. Kor. 2014. Chamomile (*Matricaria recutita*) As a Valuable Medicinal Plant. *International journal of Advanced Biological and Biomedical Research* 2(3): 823-829
- Zuraidassanaaz, N. I. 2016. Induksi Kalus Eksplan Daun Sirih Hitam (*Piper betle* L.) Dengan Kombinasi Konsentrasi Zat Pengatur Tumbuh *Indole-3-Acetic Acid* dan *Benzyl Amino Purin* (BAP). Skripsi. Fakultas Sains Dan Teknologi Universitas Airlangga