

OPTIMASI INDUKSI KALUS TANAMAN CABE JAWA (*Piper retrofractum* Vahl) DENGAN BERBAGAI VARIASI ZAT PENGATUR TUMBUH

¹Fahrauk Faramayuda, ²Elfahmi, ¹Riska Sigit Ramelan

¹ Fakultas Farmasi, Universitas Jenderal Achmad Yani, Jl. Terusan Jend. Sudirman Cimahi

² Sekolah Farmasi, Institut Teknologi Bandung, Jl. Ganesha No. 10 Bandung

Corresponding author email: ramayuda_f@yahoo.com

ABSTRAK

Cabe jawa (*Piper retrofractum* Vahl) merupakan tanaman obat yang berpotensi untuk dikembangkan dengan metode kultur jaringan. Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui pengaruh zat pengatur tumbuh (ZPT) yaitu 2,4 dichlorophenoxyacetic asam (2,4-D), 6-benzilaminopurin (BAP) dan kinetin terhadap pertumbuhan kalus dan produksi metabolit sekunder dari cabe jawa. Penelitian ini menggunakan rancangan dengan dua perbandingan ZPT yaitu 2,4-D : BAP (0 : 0,5ppm, 0,5 : 0,5ppm, 0,5 : 0ppm) dan 2,4 : Kinetin (0 : 0,5ppm, 0,5 : 0,5ppm, 0,5 : 0 ppm). Data yang dikumpulkan adalah data kualitatif (morfologi kalus termasuk tekstur, warna kalus dan metabolisme sekunder) dan data kuantitatif (kalus berat basah dan berat kering). Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan ZPT 2,4-D:BAP (0,5ppm:0,5ppm) sebagai konsentrasi optimum untuk menginduksi kalus. Metabolit sekunder dari kalus cabe jawa dianalisis dengan metode kromatografi lapis tipis (KLT) menggunakan fase gerak n-heksan : etil asetat (3:7) dan toluen : etil asetat (1:1). Berdasarkan hasil KLT tersebut menunjukkan pola kromatogram kalus cabe jawa yang menunjukkan senyawa steroid, triterpenoid dan flavonoid.

Kata Kunci : Daun Cabe Jawa, Kultur Jaringan, Zat Pengatur Tumbuh, Kromatografi Lapis Tipis.

ABSTRACT

Piper retrofractum Vahl is a medicinal plant potentially to be developed with in vitro culture method. The objectives of the research were to study the effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 6-benzilaminopurin (BAP) and kinetin on callus growth and secondary metabolism production from *Piper retrofractum* Vahl. The research used factorial completely randomized design with two factors 2,4-D : BAP (0 : 0,5ppm, 0,5 : 0,5ppm, 0,5 : 0ppm) and 2,4:Kinetin (0 : 0,5ppm, 0,5 : 0,5ppm, 0,5 : 0 ppm). Data that be collected were qualitative data (callus morphology included texture, colour of callus and secondary metabolism from Thin Layer Chromatography's method) and quantitative data (callus wet weight and callus dry weight). The result of the research indicated that the treatment with addition plant regulation 2,4-D : BAP (0,5 ppm : 0,5 ppm) on MS medium as an optimum combination concentration to induce callus. Secondary metabolites was analyzed by qualitative methods for callus and cabe jawa leaves without in vitro culture using Thin Layer Chromatography (TLC) eluted by n-hexane : acetate etil (3:7) and toluene : acetate etil (1:1). Based on TLC results show that callus cabe jawa containing steroid, triterpenoids and flavonoid.

Keyword : Cabe Jawa leaves, Plant Tissue Culture, Growth Hormone, Thin Layer Chromatography.

PENDAHULUAN

Cabe jawa telah lama dikenal sebagai tanaman yang banyak digunakan dalam jamu dan obat tradisional. Bagian yang sering digunakan adalah buah yang sudah tua tetapi belum masak, akar, dan daun yang dikeringkan⁽¹⁾. Cabe Jawa (*Piper retrofractum* Vahl) memiliki kandungan kimia yaitu zat pedas piperin, kavisin, asam palmitat, asam tetrahidropiperik, 1-undensilenil-3,4- metilendioksibenzen, piperidin, minyak asiri, isobutildeka-trans-2-trans-4-dinamid, dan

sesamin⁽²⁾. Kultur jaringan tanaman adalah metode atau teknik mengisolasi jaringan, organ, sel maupun protoplas tanaman yang sering kita sebut eksplan didalam media yang aseptik sehingga dapat tumbuh dan berkembang menjadi tanaman utuh seperti induknya⁽³⁾. Di bidang farmasi, teknik kultur jaringan sangat menguntungkan karena dapat mendapatkan metabolit sekunder untuk keperluan obat-obatan dalam jumlah besar dan dalam waktu singkat⁽³⁾. Prinsip utama dari teknik kultur jaringan adalah

setiap organ tanaman dapat menjadi tanaman baru apabila ditumbuhkan dalam kondisi yang aseptik⁽³⁾. Media buatan yang dapat dijadikan media pertumbuhan kalus cabe jawa yaitu *Murashige dan Skoog* (MS). Bagian tanaman yang digunakan pada penelitian ini yaitu daun cabe jawa. Selain media buatan, kultur jaringan harus mengandung zat pengatur tumbuh (ZPT) untuk mempengaruhi pertumbuhan morfogenesis dalam kultur sel, jaringan dan organ. Untuk mempercepat pertumbuhan pada kultur jaringan maka diperlukan suatu Zat Pengatur Tumbuh (ZPT). Variasi ZPT yang digunakan diantaranya 2,4-diphenylphenoxyacetic acid (2,4D) yang merupakan ZPT golongan Auksin. Sedangkan ZPT golongan Sitokinin adalah 6-benzilaminopurin (BAP) dan Kinetin.

METODE PENELITIAN

Alat Dan Bahan. Determinasi tanaman Cabe Jawa dilakukan di Laboratorium Taksonomi Jurusan Biologi FMIPA Universitas Padjadjaran, dan menunjukkan bahwa tumbuhan tersebut adalah benar tanaman cabe jawa (*Piper retrofractum* Vahl). Eksplan cabe jawa yang digunakan adalah bagian pucuk daun Cabe Jawa. Penanaman eksplan dilakukan dengan cara mengambil tanaman yang sebelumnya telah disterilisasi, lalu pucuk tanaman dipotong dengan menggunakan *sterile blade* kemudian tanamkan eksplan dalam media dengan isi zat pengatur tumbuh (ZPT) dengan konsentrasi yang tepat untuk menumbuhkan kultur cabe jawa. Dan di inkubasi dalam suhu dan kelembaban terjaga. Setelah tumbuh kalus, dilakukan analisis metabolit sekunder terhadap kalus kultur cabe jawa dengan kromatografi lapis tipis (KLT).

Pemeriksaan Makroskopik. Dilakukan pada simplisia Daun Cabe Jawa (*Piper retrofractum* Vahl) meliputi karakteristik fisik seperti bentuk, ukuran, warna, dan bau.

Pemeriksaan Mikroskopik. Pemeriksaan dengan mikroskopik binokuler dilakukan terhadap daun cabe jawa dan kalus cabe jawa. Pengamatan menggunakan mikroskop meliputi tipe stomata dan rambut penutup.

Pembuatan Ekstrak Daun Cabe Jawa. Dilakukan dengan metode ekstraksi dingin yaitu dengan maserasi menggunakan pelarut bertingkat diantaranya n-heksan, etil asetat dan etanol.

Penapisan Fitokimia Simplisia Dan Ekstrak Daun Cabe Jawa. Identifikasi alkaloid, flavonoid, tanin, polifenol, saponin, steroid-triterpenoid, monoterpenoid-seskuiterpenoid dan kuinon

Analisis Metabolit Sekunder dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT).

Digunakan perbandingan pengembang yaitu toluen : etil asetat (1:1) dan etil asetat : n-heksan (7:3) Selanjutnya dilakukan identifikasi kandungan dengan memberikan penampak bercak yang spesifik seperti H₂SO₄ 10% dalam metanol, Sitroborat dan Liebermann-Bouchard. Profil KLT ekstrak kalus dan eksplan cabe jawa hasil kultur jaringan dibandingkan dengan eksplan cabe jawa kontrol dan ekstrak daun cabe jawa yang tumbuh di habitat asalnya.

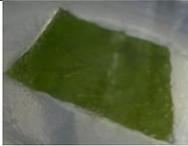
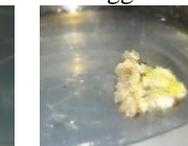
HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan untuk menumbuhkan tanaman cabe jawa dengan teknik kultur jaringan dan menganalisis metabolit sekunder hasil kultur jaringan. Sebelum dilakukan penanaman dengan metode kultur jaringan, dilakukan sterilisasi terlebih dahulu pada daun cabe jawa. Sterilisasi daun cabe jawa dilakukan dengan menggunakan Alkohol 70% selama 1 menit kemudian dilakukan perendaman pada natrium hipoklorit konsentrasi 2% v/v selama 5 menit, kemudian dibilas dengan air steril sebanyak 3 kali masing-masing selama 1 menit dengan tujuan untuk membersihkan daun dari larutan alkohol dan natrium hipoklorit. Konsentrasi ZPT yang menunjukkan aktivitas biologi pada eksplan cabe jawa yaitu 2,4-D (0.5ppm), 2,4-D-BAP (0.5ppm:0.5ppm) dan kinetin (0.5ppm). 2,4-D (0.5ppm) dan kinetin (0.5ppm) ditandai dengan menggulungnya eksplan dan penambahan ukuran volume, sedangkan perbandingan konsentrasi ZPT pada 2,4-D-BAP (0.5ppm:0.5ppm) menunjukkan terbentuknya kalus. Salah satu indikator adanya pertumbuhan dalam kultur jaringan adalah munculnya kalus pada eksplan. Kalus merupakan sel-sel yang muncul bergerombol pada salah satu atau seluruh irisan eksplan⁽⁴⁾. Kalus yang muncul dari daerah bekas pelukaan akan berwarna putih, lama kelamaan berubah menjadi kalus yang berwarna hijau. Tahapan pembentukan kalus pada eksplan yaitu kalus yang muncul pada bekas potongan pada eksplan awalnya bersifat remah, selanjutnya ketika sel terus berproliferasi maka lama-kelamaan kalus menjadi kompak dan berwarna putih⁽⁵⁾. Kalus yang berwarna putih merupakan jaringan embrionik yang belum mengandung kloroplas, tetapi memiliki kandungan butir pati yang tinggi. Dengan, penambahan zat pengatur tumbuh terutama sitokinin dan stimulus

cahaya proplastid yang terdapat dalam jaringan parenkim tersebut berdiferensiasi menjadi plastid yang mengandung klorofil, sehingga kalus berubah menjadi berwarna

hijau. Rasio sitokinin dan auksin menentukan morfogenesis yang terjadi pada kultur kalus⁽⁶⁾. Kalus yang ditempatkan pada media dengan rasio.

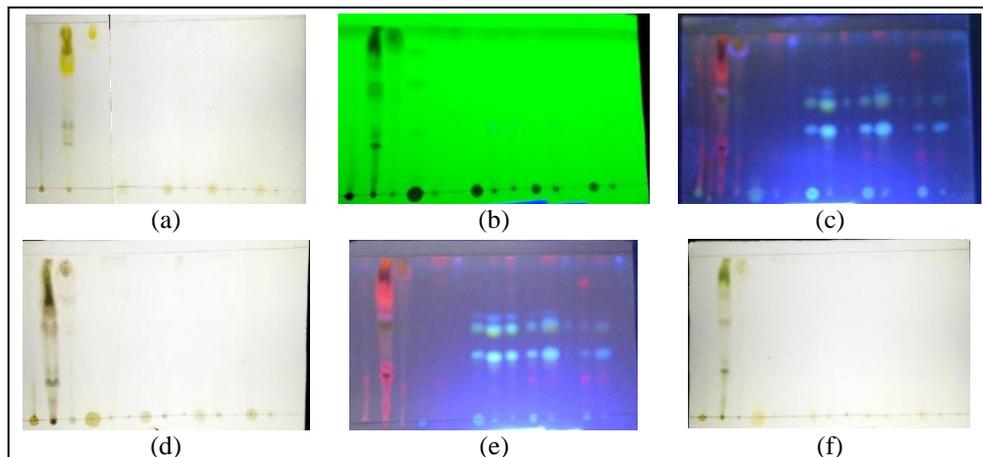
Tabel 1. Kalus Cabe Jawa (*Piper retrofractum* Vahl) Hasil Kultur Jaringan. Dengan Perbandingan Zat Pengatur Tumbuh.

ZPT	Perubahan Eksplan Cabe Jawa			
Kontrol (tanpa ZPT)				
	Minggu ke 1	Minggu ke 2	Minggu ke 3	Minggu ke 4
2,4-D (0.5ppm)				
	Minggu ke 1	Minggu ke 2	Minggu ke 3	Minggu ke 4
Kinetin (0.5 ppm)				
	Minggu ke 1	Minggu ke 2	Minggu ke 3	Minggu ke 4
2,4-D:BAP (0.5ppm:0.5 ppm)				
	Minggu ke 1	Minggu ke 3	Minggu ke 7	Minggu ke 9

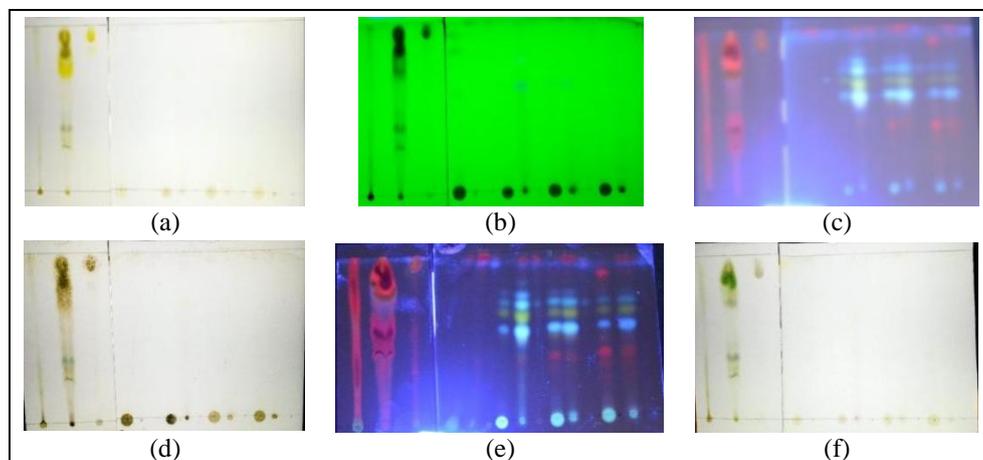
Sitokinin lebih tinggi daripada auksin biasanya menghasilkan banyak tunas dan sedikit akar sedangkan kalus yang ditempatkan pada media⁽⁷⁾ Sedangkan pada konsentrasi ZPT 2,4-D (0,5ppm) dan Kinetin (0,5ppm) tidak muncul kalus. Kalus yang tidak muncul ini dimungkinkan karena auksin endogen pada eksplan cabe jawa belum mampu menginduksi kalus, dengan kata lain eksplan mempunyai kandungan auksin yang rendah, sehingga masih membutuhkan tambahan auksin eksogen pada media kultur dan auksin eksogen yang ditambahkan belum bisa menumbuhkan kalus. Hal ini yang terjadi pada eksplan yang ditambahkan ZPT auksin 2,4-D (0.5ppm).

Setelah muncul kalus pada eksplan cabe jawa kemudian dilakukan ekstraksi untuk dianalisis

senyawa-senyawa yang terkandung dalam kalus cabe jawa secara kualitatif dengan metode kromatografi lapis tipis. Tak hanya kalus, eksplan cabe jawa yang menggulung pun dianalisis metabolit sekundernya. Ekstraksi dilakukan dengan cara bertingkat, dimana kalus dan eksplan cabe jawa yang menggulung diekstraksi, metode ekstraksi yang digunakan yaitu maserasi menggunakan pelarut bertingkat yaitu n-heksan untuk menarik senyawa yang bersifat non polar, etil asetat untuk menarik senyawa yang lebih bersifat semi polar dan etanol untuk menarik senyawa yang lebih bersifat polar. Setelah itu dianalisis dengan kromatografi lapis tipis.



Gambar 1. Profil kromatogram kalus cabe jawa, fase diam KLT GF254, fase gerak toluen:etil asetat (1:1), (a) visual (b) UV 254 nm (c) UV 365 nm (d) penampak bercak Liebermann-Bouchard (e) penampak bercak Sitroborat (f) penampak bercak H₂SO₄ 10% metanol



Gambar 2. Profil kromatogram kalus cabe jawa, fase diam KLT GF254, fase gerak etil asetat:n-heksan (7:3), (a) visual (b) UV 254 nm (c) UV 365 nm (d) penampak bercak Liebermann-Bouchard (e) penampak bercak Sitroborat (f) penampak bercak H₂SO₄ 10% metanol

Secara visual daun cabe jawa hasil kultur jaringan dengan fase gerak toluen:etil asetat (1:1) terdeteksi adanya bercak berwarna gelap pada nomor 8,9,11 dengan Rf 0.4. Pada UV 365 nm terdeteksi adanya bercak biru pada nomor 7,8,10,11,13,14 dengan Rf 0.4, bercak biru kehijauan pada nomor 7,8,10,11, dengan Rf 0.5, dengan fase gerak etil asetat : n-heksan (7:3) menunjukkan bercak hitam dibawah UV 254 nm pada nomor 8,10,11 dengan Rf 0.5. Terdapat bercak berfluoresensi biru dibawah UV 365 nm pada nomor 8,11,13,14 dengan Rf 0.5. Terdapat bercak kuning berfluoresensi pada nomor 8,10,13,14 dengan Rf 0.6. Terdapat bercak biru berfluoresensi pada nomor 8,10,11 dengan Rf 0.64.

Setelah ekstrak cabe jawa di KLT dengan perbandingan fase gerak etil asetat : n-heksan (7:3) dan etil asetat : toluen (1:1), dilakukan pengamatan adanya senyawa organik pada

ekstrak cabe jawa dengan penyemprotan pada plat KLT menggunakan penampak bercak H₂SO₄ 10% dalam metanol yang kemudian dilakukan pemanasan pada plat KLT. Adanya senyawa organik ditandai dengan perubahan warna bercak pada plat KLT setelah pemanasan. Secara visual pada daun cabe jawa tanpa kultur jaringan terdapat perubahan warna dari bercak hijau menjadi berwarna coklat, pada kalus dan eksplan cabe jawa kultur jaringan juga terdeteksi secara visual namun karena konsentrasi ekstrak yang sedikit sehingga bercak yang timbul tidak begitu jelas, bercak hitam pada kalus dan eksplan cabe jawa terdapat pada nomor 8 dengan Rf 0.5 dan 0.6. terdapat bercak hitam pada nomor 13 dengan Rf 0.5 dan 0.6.

Dilakukan analisis dengan penampak bercak spesifik diantaranya Liebermann-Bouchard dan Sitroborat. Pada plat KLT yang disemprot penampak bercak Liebermann-Bouchard terlihat

bercak berwarna hijau dan coklat pada ekstrak cabe jawa non kultur, ekstrak etil dan n-heksan kalus cabe jawa, dan ekstrak etanol ekplan cabe jawa dengan zpt kinetin 0.5ppm. ini menunjukkan senyawa golongan triterpenoid, golongan steroid yang ditandai bercak hijau, kemungkinan adanya senyawa flavonoid pun pada semua ekstrak kalus dan ekplan cabe jawa ditunjukkan dengan bercak yang memancarkan warna lebih terang pada UV 366 nm setelah disemprot penampak bercak sitroborat. seperti bercak biru, biru kehijauan. Pada pengembang toluen : etil asetat (1:1) bercak biru lebih terang, bercak kuning lebih terang, dan bercak biru lebih terang pada pengembang etil asetat : n-heksan (7:3).

Ada beberapa tanaman yang mengandung senyawa metabolit sekunder tertentu yang dapat ditingkatkan produksinya melalui kultur jaringan, tetapi pada beberapa tanaman yang lain, kultur jaringan justru tidak berhasil meningkatkan kandungan metabolit tanaman⁽⁸⁾. Ekspresi metabolit sekunder pada tanaman yang dikulturkan selain tergantung dari jenis ekplan yang dipakai juga terkait dengan jenis dan konsentrasi dari zat pengatur tumbuh yang ditambahkan dalam media. Pemberian zat pengatur tumbuh pula 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.

KESIMPULAN DAN SARAN

Daun cabe jawa (*Piper retrofractum* Vahl) dapat menghasilkan kalus pada perbandingan Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) 2,4-D : BAP 0.5ppm : 0.5ppm dan menghasilkan respon perkembangan ekplan lebih cepat pada ZPT 2,4-D 0.5ppm dan Kinetin 0.5ppm. Terdapat perbedaan pola Kromatografi Lapis Tipis antara ekplan cabe jawa dan daun cabe jawa tanpa kultur jaringan menggunakan pengembang n-heksan : etil asetat

(3:7) dan toluene : etil asetat (1:1). Hasil KLT dari ekstrak kalus cabe jawa dan ekstrak ekplan cabe jawa dengan teknik kultur jaringan kemungkinan mengandung senyawa steroid, triterpenoid dan flavonoid. Perlu dilakukan analisis dan isolasi lebih lanjut untuk mengetahui kadar senyawa metabolit sekunder dan struktur senyawa yang terkandung pada kalus cabe jawa.

DAFTAR PUSTAKA

- Badan POM RI.. *Acuan Sediaan Herbal*. Jakarta. 2010; 5: 10.
- Cronquist, Arthur. *An Integrated System Of Classification Of Flowering Plants*. The New York Botanical Garden. United States of America: Columbia University Press; 1981. Hal. 87-89.
- Fransworth, N.R. *Biological and Phytochemical Screening of Plants*, J. Pharm.Sci. Washington D.C : American Pharmaceutical Association. 1966; 55(3): 243-269.
- Gunawan, L. W. *Teknik Kultur Jaringan Tumbuhan*. Bogor : Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman.PAU Bioteknologi IPB. 1992.
- Hendaryono, Sriyanti P Daisy., Ari Wijayani. *Teknik Kultur Jaringan; Pengenalan dan Petunjuk Perbanyakan Tanaman Secara Vegetatif-Modern*. Yogyakarta: Kanisius; 1994.
- Hutapea, Johnny, Ria, Dr., dkk. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia III*. Jakarta: Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan;1994.
- Kieber, Joseph J. *The Arabidopsis Book: Cytokinins*. American Society of Plant Biologists. University of North Carolina, Biology Department : Carolina. 2002.
- Tsuro, M et al. *Comparative Effect of Different Types of Cytokinin for Shoot Formation and Plant Regeneration in Leaf-derived Callus of lavender. (Lavandula vera DC)*. Laboratory of Plant Breeding Science, Faculty of Agriculture, Kyoto Prefectural University. Japan. 1998. 606-8522.