

**PENGARUH 2,4-D TERHADAP INDUKSI EMBRIO SOMATIK Tanaman Gambir
(*Uncaria gambir* Roxb.)**

Oleh:

Rantih Fadhlya Adri, S.Si, M.Si

(Dosen Fakultas Kesehatan & MIPA Universitas Muhammadiyah Sumbar)

ABSTRAK

Penelitian tentang pengaruh 2,4-D terhadap pembentukan embrio somatik Tanaman Gambir (*Uncaria gambir* Roxb.) telah dilakukan dari bulan Agustus sampai Desember 2011. Penelitian ini terdiri atas perlakuan beberapa konsentrasi 2,4-D yaitu: 0 mg/l (kontrol) , 1 mg/l, 2 mg/l, dan 4 mg/l. Dari penelitian ini diketahui bahwa konsentrasi 2,4-D sebesar 1 mg/l mampu membentuk embriosomatik secara langsung dengan tahapan perkembangan embrio yang diperoleh yaitu proembrio 3 sel, proembrio 4 sel dan fase *globular*.

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara pemasok Gambir dunia dengan persentase ekspor mencapai 80%, dimana 80% dari Gambir yang diekspor tersebut berasal dari Provinsi Sumatera Barat pada daerah Kabupaten Lima Puluh Kota (70%), Kabupaten Pesisir Selatan (25%), dan Wilayah lain (5%) (Djanun, 1998).

Permintaan ekspor Gambir terus mengalami peningkatan sepanjang tahun dengan negara tujuan ekspor Banglades, India, Pakistan, Taiwan, Jepang, Korea Selatan, Perancis dan Swiss (Pambayun, Gardjito, Sudarmadji dan Kuswanto, 2007)

Dalam dunia industri Gambir banyak digunakan sebagai bahan baku industri farmasi dan makanan, diantaranya bahan baku obat penyakit hati dengan paten "catergen" (Hadad, Ahmadi, Herman, Supriadi dan Hasibuan, 2002).

Berbagai potensi yang dimiliki Gambir membuat permintaan akan tanaman Gambir selalu meningkat. Menurut Hadad, dkk (2002) volume ekspor tahun 2000 sebanyak 6.633 ton dengan nilai US\$ 8.274.000,- meningkat pada tahun 2004 menjadi 12.438 ton dengan nilai US\$ 9.694.000,-. Berarti terjadi peningkatan volume ekspor sebesar 87,49% dan peningkatan nilai 17,16% selama kurun waktu 5 tahun. Data dari Dinas Perkebunan Propinsi Sumatera Barat (2011) menyatakan bahwa pada tahun 2008 produksi Gambir pada daerah potensi terbanyak di Sumatera yaitu Lima puluh Kota mencapai 9.997 ton dan mengalami peningkatan pada tahun 2009 hingga mencapai 11.525 ton, namun pada tahun 2010 lalu mengalami penurunan hingga 10.297 ton dan makin berkurang hingga tahun 2011.

Permintaan akan Gambir yang selalu meningkat sehingga mengharuskan dilakukannya peningkatan penyediaan Gambir dengan kualitas unggul. Salah satu upaya yang dapat dilakukan masyarakat adalah melalui perluasan areal tanam, namun upaya ini tidak dapat berjalan dengan baik karena semakin terbatasnya areal tanam potensial yang ada saat ini. Maka solusi lain yang dapat dilakukan adalah dengan Teknik Kultur Jaringan melalui Embrio somatik yang dapat menghasilkan bibit unggul dalam waktu yang singkat dan jumlah yang banyak.

Penelitian mengenai tanaman Gambir dibidang kultur jaringan telah pernah dilakukan oleh Ferita, Satria dan Djafarudin (2000) mengenai perbanyakan tanaman Gambir melalui induksi kalus secara *in vitro*, yang menginformasikan bahwa kadar 2,4-D dan Kinetin yang seimbang sebesar 0,5 ppm dapat menginduksi kalus sebesar 5%. Sedangkan penelitian induksi embrio somatik dengan penambahan 2,4-D, telah dilakukan pada beberapa jenis tanaman diantaranya penginduksian embrio somatik pada tanaman kopi arabika (*Coffea arabica*) yang dilakukan oleh Riyadi dan Tirtoboma (2004) telah berhasil menginduksi embrio somatik pada medium MS standar dengan penambahan 4 mg/l 2,4-D dan dikombinasikan dengan 0,1 mg/l kinetin

METODE PENELITIAN

Percobaan tahap ini dilakukan dengan metode eksperimen menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang bertujuan untuk menginduksi embrio somatik pada medium MS dengan penambahan 0,1 mg/l Kinetin. Sebagai perlakuan adalah beberapa konsentrasi 2,4-D, yaitu:

A = 0 mg/l (Kontrol)

B = 1 mg/l

C = 2 mg/l

D = 4 mg/l

Total unit percobaan pada tahap I adalah $4 \times 6 = 24$ unit

Prosedur Penelitian

Sterilisasi alat

Sterilisasi dilakukan pada semua alat yang digunakan. Botol kultur di rendam satu malam dengan deterjen kemudian dibilas sampai bersih, setelah itu direndam dengan bayclean selama satu malam, dibilas dan dikeringkan. Selanjutnya dimasukkan ke dalam plastik kaca, diikat dengan karet gelang dan disterilisasi menggunakan autoklaf pada temperatur 121°C pada tekanan 15 psi selama 20 menit. Sterilisasi ini juga dilakukan untuk alat-alat gelas lainnya.

3.4.1.2 Pembuatan Medium

Medium yang digunakan adalah medium MS dengan penambahan 0,1 mg/l kinetin, arang aktif dan 2,4-D sesuai perlakuan. Medium dibuat sebanyak 400 ml. Dengan melarutkan 20 ml stok I, 2 ml stok II, 2 ml stok III, 2 ml stok IV, 4 ml stok V dengan penambahan 0,1 mg/l kinetin dilarutkan kedalam 200 ml akuades steril dan diaduk sampai homogen yang kemudian dibagi menjadi 4 untuk masing-masing perlakuan. Selanjutnya setiap larutan medium ditambahkan dengan 2,4-D dengan konsentrasi sesuai perlakuan yaitu 0 mg/l, 1 mg/l, 2 mg/l dan 4 mg/l. Kemudian setiap perlakuan ditambahkan 3 g gula dan ditambah 0,1 g arang aktif kemudian diatur pH nya 5,8-6,00 menggunakan pH-meter. Jika pH nya lebih tinggi medium ditetesi HCl 0,1 N dan jika pH nya lebih rendah ditetesi dengan NaOH 0,1 N. Volume akhir setiap perlakuan dicukupkan menjadi 100 ml. Setelah itu ditambahkan agar sebanyak 0,7 g pada masing-masingnya. Kemudian media dimasak hingga mendidih, selanjutnya medium dimasukkan ke dalam botol kultur, ditutup dengan aluminium foil, dilapisi kertas dan diikat dengan karet gelang lalu disterilisasi dengan autoklaf selama 20 menit pada suhu 121°C dan tekanan 15 psi. Setelah disterilisasi medium di inkubasi selama 3 hari untuk melihat ada atau tidaknya medium yang terkontaminasi, bila terdapat medium yang terkontaminasi segera dilakukan pemisahan dan dikeluarkan dari ruangan inkubasi.

Persiapan Eksplan

Eksplan yang digunakan adalah daun muda tanaman Gambir varietas udang yang berasal dari biji yang dikembangbiakan secara in vitro, dimana biji tersebut diperoleh dari perkebunan Gambir Muoro paiti Kabupaten Lima Puluh Kota. Daun muda dari tanaman Gambir disterilisasi dengan cara merendamnya kedalam alkohol 70% selama satu menit dan dibilas kembali dengan akuades steril. Kemudian dikeringkan dengan tisu steril. Setelah daun steril, dipotong sebesar 1x1 cm dan diletakkan pada cawan petri steril dan siap untuk ditanam.

Penanaman Eksplan

Penanaman dilakukan didalam L AFC yang sebelumnya telah di sinari dengan UV selama 1 jam lengkap dengan alat dan bahan yang dibutuhkan dalam penanaman.

Eksplan daun Gambir yang sudah steril, dimasukkan ke dalam botol kultur yang telah berisi medium perlakuan menggunakan pinset secara aseptis. Kemudian diletakkan pada ruang gelap 12 minggu dengan waktu sub kultur tiap 4 minggu.

Analisis Data

Data hasil penelitian, yaitu: Persentase hidup eksplan, tekstur kalus, dan embrio somatik yang terbentuk disajikan secara *deskriptif*.

HASIL PENELITIAN**Persentase hidup eksplan**

Tabel 1. Persentase hidup eksplan tanaman Gambir pada 3 mst dan 12 mst

Perlakuan	Persentase hidup pada 3 mst (%)	Persentase hidup pada 12 mst (%)
A (0 mg/l 2,4-D)	100	100
B (1 mg/l 2,4-D)	100	100
C (2 mg/l 2,4-D)	100	33,3
D (4 mg/l 2,4-D)	100	33,3

Berdasarkan data persentase eksplan yang hidup diketahui bahwa eksplan tanaman Gambir dapat hidup dengan baik pada minggu ke-3 setelah penanam dengan persentase mencapai 100% untuk semua perlakuan, akan tetapi pada minggu ke-12 terjadi penurunan pada perlakuan C (2 mg/l 2,4-D) dan D (4 mg/l 2,4-D) hingga persentase yang hidup hanya mencapai 33,3%.

Tekstur kalus

Tabel 2. Tekstur kalus yang terbentuk pada eksplan tanaman Gambir

Perlakuan	Persentase kalus yg terbentuk (%)	Waktu muncul kalus	Tekstur kalus	Warna Kalus	Ket
A (0 mg/l 2,4-D)	83,3	8 mst	Remah hingga kompak bernodul, rhizogenik	Putih kekuningan, Kuning kecoklatan, hijau	40% bersifat embriogenik
B (1 mg/l 2,4-D)	-	-	-	-	ES langsung
C (2 mg/l 2,4-D)	-	-	-	-	ES langsung
D (4 mg/l 2,4-D)	33,3	6 mst	Remah dan basah	Hijau kecoklatan hingga coklat tua.	Non embrio Genik

Ket: ES = Embrio Somatik

Dari hasil pengamatan diketahui bahwa eksplan yang mampu membentuk kalus embriogenik adalah eksplan yang berada pada perlakuan A (0 mg/l 2,4-D) yang muncul pada 8 mst dimana dari 83,3% kalus yang terbentuk 40% diantaranya bersifat embriogenik. Kalus yang terbentuk pada perlakuan D (4 mg/l 2,4-D) bersifat non embriogenik yang muncul pada 6 mst dengan persentase 33,3%, sedangkan perlakuan B (1 mg/l 2,4-D) dan C (3 mg/l 2,4-D) tidak membentuk kalus namun mengalami perkembangan embrio somatik langsung, sehingga noduler-noduler ditemukan pada bagian bekas potongan dan tulang daun dari eksplan tanpa didahului oleh pembentukan kalus. Wiendi dkk (1999) *cit.* Purnamaningsih (2004) menyatakan bahwa embriogenesis langsung terjadi apabila jaringan eksplan mengalami diferensiasi membentuk embrioid tanpa melalui pembentukan kalus.

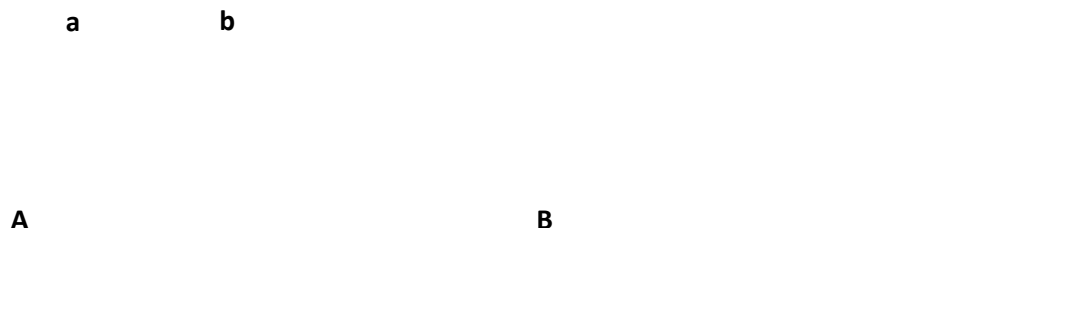
Pada perlakuan A (0 mg/l 2,4D) sebesar 40 % dari kalus yang terbentuk bersifat embriogenik dengan tekstur kompak bernodul dan berwarna putih hingga putih kehijauan, dimana kalus kompak bernodul ini muncul diatas permukaan kalus remah setelah 9 mst.

Mooenir (1990) *cit.* Husen, Wardiyati dan Sitompul (2001) menyatakan bahwa kalus kompak yang memiliki struktur seperti nodul (*Nodule-like structure*) merupakan massa proembrionik dan dapat digunakan sebagai inokulum untuk diinduksi sebagai embrio somatik.

Munculnya kalus embriogenik pada perlakuan A yaitu medium MS tanpa 2,4-D namun dengan penambahan 0,1 mg/l kinetin menyebabkan dugaan bahwa tanaman Gambir memiliki auksin endogen yang cukup tinggi dan mengalami keseimbangan dengan kinetin yang ditambahkan hingga terbentuk kalus. Widiastoety, Syafril dan Haryanto (1991) menyatakan bahwa pembentukan kalus terjadi jika konsentrasi auksin dan sitokinin berimbang.

Selain bersifat embriogenik, kalus pada perlakuan A (0 mg/l 2,4-D) juga membentuk akar pada 10 mst dan terus berkembang hingga akhir pengamatan (12 mst) (Gambar 3). Purnamaningsih (2008) menyatakan bahwa kalus yang lebih cepat membentuk akar daripada tunas disebut dengan kalus rhizogenik, hal yang diduga menjadi penyebab utamanya adalah adanya ketidakseimbangan kandungan auksin dan sitokinin di dalam eksplan.

Berbeda dengan kalus yang terbentuk pada perlakuan A (0 mg/l 2,4-D), kalus pada perlakuan D dengan penambahan 4 mg/l 2,4-D memiliki tekstur yang remah (friabel) dan basah, kalus ini tidak memiliki nodul dan berwarna cenderung gelap yaitu hijau tua kecoklatan hingga coklat tua dan kemudian mulai menghitam (Gambar 3). Hal ini diduga karena pemberian 2,4-D yang terlalu tinggi yaitu 4 mg/l. Sesuai dengan pendapat George and Sherrington (1983) bahwa pemakaian 2,4-D dalam konsentrasi tinggi dapat menghambat pertumbuhan bahkan mematikan sel pada kalus maupun jaringan tanaman yang ditumbuhkan. Peningkatan konsentrasi auksin (2,4-D) juga akan meningkatkan friabilitas kalus (Bron, 1990 *cit.* Husen, dkk, 2001).



Gambar 3. Kalus yang terbentuk pada 12 mst yang diamati menggunakan mikroskop binokuler, perbesaran 2xA. Kalus embriogenik yang terbentuk pada perlakuan A (0 mg/l 2,4-D) (a = akar b = nodul) B. Kalus non embriogenik pada perlakuan D berstruktur remah dan basah (4 mg/l 2,4-D).

Embrio somatik

Tabel 3. Persentase embrio somatik yang terbentuk

Perlakuan	Embrio somatik yang terbentuk	Persentase embrio somatik yang terbentuk	Waktu muncul embrio somatik
A (0 mg/l 2,4-D)	-*	*40%	10 mst
B (1 mg/l 2,4-D)	+	83,3%	5 mst
C (2 mg/l 2,4-D)	+	16,6%	8 mst
D (4 mg/l 2,4-D)	-	-	-

Keterangan:

- = tidak ada embrio somatik yang terbentuk
- * = tidak ada embrio somatik tetapi memiliki kalus embriogenik
- + = ada embrio somatik yang terbentuk

Berdasarkan Tabel 3 diketahui bahwa embrio somatik dapat terbentuk pada perlakuan B (1 mg/l 2,4-D) dan C (2 mg/l 2,4-D), sedangkan perlakuan A (0 mg/l 2,4-D) dapat membentuk kalus embriogenik, namun perlakuan D (4 mg/l 2,4-D) tidak dapat membentuk embrio somatik dengan respon pembentukan kalus non embriogenik.

Embrio somatik yang terbentuk pada perlakuan B (1 mg/l 2,4-D) dan C (2 mg/l 2,4-D) tergolong pada embriogenesis somatik langsung karena eksplan potongan daun muda tanaman Gambir secara langsung membentuk proembrio tanpa melalui tahapan kalus terlebih dahulu (Gambar 4). Wiendi dkk (1991 *cit.* Purnamaningsih, 2004) menyatakan embriogenesis langsung yaitu terjadi diferensiasi jaringan eksplan membentuk embrioid tanpa melalui pembentukan kalus.

Embrio somatik langsung yang ditunjukkan oleh perlakuan C (3 mg/l 2,4-D) hanya mencapai 16,6% yang muncul pada 8 mst, namun pada 11 mst mulai mengalami pencoklatan dan mati pada akhir pengamatan. Eksplan lain dari perlakuan ini sebenarnya juga telah menunjukkan respon yang cukup berarti dengan mengalami pembengkakan dibekas potongan pada minggu ke-3 mst yang artinya 2,4-D mulai diserap jaringan daun, namun gagal beregenerasi dan eksplan mengalami pencoklatan atau *browning* pada 8 mst, sehingga embrio somatik pada perlakuan C tidak dapat diamati.

Terbentuknya embrio somatik pada perlakuan B (1 mg/l 2,4-D) dengan persentase tertinggi (83,3%) dan waktu yang tercepat bila dibandingkan dengan perlakuan lainnya menandakan bahwa konsentrasi 2,4-D optimal untuk menginduksi embrio somatik pada tanaman Gambir adalah 1 mg/l dengan penambahan 0,1 mg/l kinetin. George and Sherrington (1984) menyatakan konsentrasi auksin (seperti 2,4-D) yang optimal akan menginduksi embrio somatik bahkan dalam waktu yang lebih cepat dan jumlah yang banyak.

Inisiasi pertumbuhan proembrio tergolong lambat yang mulai terlihat pada 5 mst untuk perlakuan B (1 mg/l 2,4-D) dan 8 mst untuk perlakuan C (2 mg/l 2,4-D). Proembrio ini mulai tumbuh pada pinggir eksplan dan pada bagian eksplan yang bersentuhan langsung dengan medium yang tampak sebagai tonjolan-tonjolan berwarna hijau yang tersusun berjejer (Gambar 4). Keadaan ini mirip dengan hasil penelitian Trisnawati dan Sumardi (2000) yang meneliti struktur perkembangan embrio somatik bawang putih (*Allium sativum* L.) dimana proembrio berupa tonjolan-tonjolan hijau muncul pada minggu ke-3 pada medium MS yang ditambahkan 2 mg/l IAA, 2 mg/l kinetin dan 0,5 mg/l 2,4-D.

A**B**

Gambar 4. Proembrio yang terbentuk. A= pada perlakuan B (5 mst), B= pada perlakuan C (8mst). Daerah yang dilingkar merupakan proembrio yang tumbuh.

Embrio somatik pada perlakuan B (1 mg/l 2,4-D) yang terus mengalami perkembangan hingga akhir pengamatan yaitu 12 mst, memiliki warna hijau yang lebih terang dibandingkan dengan awal pembentukannya, namun embrio tetap mendominasi bagian pinggir eksplan dan tidak meluas hingga menutupi eksplan (Gambar 5). Pengamatan mikroskopis dengan menggunakan mikroskop CETI memperlihatkan embrio yang terbentuk pada 12 mst ini berada pada fase *globular* yang merupakan tahap awal dari perkembangan

embrio, namun juga ditemukan fase proembrio, yang berada pada fase 3 sel dan 4 sel (Gambar 6). Menurut Purnamaningsih (2004) bahwa tahap perkembangan embrio somatik identik dengan embriozigotik dimana sel membelah secara cepat dan berkembang dalam beberapa fase, yaitu *globular*, *hati*, *torpedo* dan kecambah hingga terbentuknya planlet.

Gambar 5. Fase *globular* dari embrio somatik pada perlakuan B (1 mg/l 2,4-D) yang diamati pada 12 mst dengan mikroskop binokuler pada perbesaran 2x (ditunjukkan oleh daerah yang dilingkar).

Perkembangan embrio somatik pada penelitian ini identik dengan pola perkembangan embrio somatik pada tanaman anggrek bulan (*Phalaenopsis amabilis* L.) yang dilakukan Utami (2007) dimana ditemukan proembrio 2 sel yang tidak sama besar, selanjutnya terjadi pembelahan secara cepat menghasilkan proembrio 3 sel dan 5 sel, kemudian embrio fase *globular*. Ditemukannya fase proembrio 3 sel dan 4 sel juga menandakan bahwa perkembangan embrio tidak seragam.

A**B****C**

Gambar 6. Fase 3 sel, 4 sel dan globular pada perlakuan B (1 mg/l 2,4-D) yang diamati pada minggu 12 setelah tanam A= fase 3 sel, B= fase 4 sel, C= fase globular. Pengamatan menggunakan mikroskop CETI dengan perbesaran 100x(yang ditunjuk tanda panah)

SIMPULAN

Dari hasil penelitian yang telah diperoleh dapat disimpulkan bahwa zat pengatur tumbuh 2,4-D pada konsentrasi 1 mg/l dapat menginduksi embrio somatik secara langsung dengan tahap perkembangan yang ditemukan yaitu proembrio 3 sel, proembrio 4 sel dan faseglobular.

DAFTAR PUSTAKA

- Djanun, L.N. C. 1998. *Peluang ekspor Gambir di pasar internasional*. BPEN. Depperindak Jakarta
- Ferita, I, Satria, B dan Djafaruddin. 2000. Perbanyak Gambir (*Uncaria gambir*) melalui induksi kalus secara *in-vitro*. *Jurnal Stigma VIII Januari-Maret 2000*
- George, E. F. and P.D. Sherrington. 1984. *Plant propagation by tissue culture*. Handbook and Directory of Commercial Laboratories.
- Hadad, M, N.R Ahmadi, M. Herman, H. Supriadi, H.M Hasibuan. 2002. *Teknologi budidaya dan pengolahan hasil Gambir*. Balai penelitian Tanaman Rempah dan Berbagai Tanaman Industri. Bogor
- Husen, S. T. Wardiyati, S.M. Sitompul. 2000. Induksi embriogenesis somatik pada eksplan kotiledon mangga (*Mangifera indica*.L). *Jurnal Stigma an Agricultural Science Vol. 8. No. 1. Januari-Maret 2004*.
- Pambayun, R, Gardjito, M, Sudarmadjidan S, Kuswanto. 2007. Kandungan fenol dan sifat anti bakteri dari berbagai jenis ekstrak produk gambir (*Uncaria gambir* Roxb). *Jurnal Farmasi Indonesia, 18(3), 141 – 146, 2007*
- Purnamaningsih, R. 2004. Regenerasi tanaman melalui embriogénesis somatik dan beberapa gen yang mengendalikannya. *Buletin Agrobio Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan. Bogor*
- Riyadi, I dan Tirtoboma. 2004. Pengaruh 2,4-D terhadap induksi embrio somatik Kopi Arabika (*Coffea arabika*). *Buletin Plasma Nutfah Vol.10 No.02*
- Trisnawati, N dan N. I. Sumardi. 2000. Struktur dan perkembangan embrio somatik pada Bawang Putih (*Allium sativum* L.) secara *in vitro*. *Prosiding Seminar Hasil Penelitian Pengembangan Bioteknologi III. Cibinong*
- Utami, E. S. W., I. Soemardi, Taryono, E. Semiarti. 2007. Embriogenesis somatik Anggrek Bulan (*Phalaenopsis amabilis* L.) bl: struktur dan pola perkembangan. *Berk. Penel. Hayati: 13 (33–38), 2007*
- Widiastoety, D., Syafrildan B. Haryanto. 1991. Kulturin vitro AnggrekDendrobuidalam media cair. *Journal Holticultura 1 (3): 6-10*