

Mikropropagasi *Rubia akane* Nakai dari Eksplan Tunas Pucuk dan Buku (Micropropagation of *Rubia akane* Nakai Initiated from Shoot Tip and Node Explants)

Betalini Widhi Hapsari^{1*} & Tri Muji Ermayanti¹

¹Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI

Jl. Raya Bogor Km 46 Cibinong Bogor 16911, *E-mail: betalini_widhi@yahoo.com

ABSTRACT

Rubia akane Nakai is a medicinal plant which contains antraquinone and natural dyes producing plants because it contains alizarin and purpurin. Propagation of this plant is usually done through seeds. One alternative to mass propagation which is not seasonal dependent is by tissue culture techniques. The purpose of this study was to conduct *R. akane* micropropagation on MS media containing cytokinin Kinetin or BAP respectively at 0 (control); 0,5; 1; and 2 ppm using shoot tips and nodes explants. The explants used were shoot containing 1 bud and shoot containing 2 buds, and single node. The results showed that 8 weeks after planting, the highest shoots were produced from MS media without cytokinins from shoot containing 1 bud explants that were 8,36 cm, the highest total number of leaves was produced on MS media with the addition of 0,5 ppm Kinetin at 45,86, the number the highest internodes was obtained from shoots containing 2 buds on MS media with the addition of 0,5 ppm BAP which is 4,72 segments, the highest number of lateral shoots was obtained from shoots containing buds planted on MS media which were 4,57 shoots, and the highest number of roots was obtained from shoot containing 1 shoot planted on MS media that was 9,14. The survival rate of planlet in the greenhouses from MS media containing BAP (83,33%) was higher compared to planlets derived from MS media containing Kinetin (60,42%).

Keywords: *Rubia akane* Nakai, BAP, *in vitro*, kinetin, sitokinin, mikropropagasi.

ABSTRAK

Rubia akane Nakai merupakan tanaman obat karena mengandung antraquinon dan tanaman penghasil pewarna alami karena mengandung alizarin dan purpurin. Tanaman ini biasanya diperbanyak melalui biji. Salah satu alternatif perbanyakannya secara massal dan tidak tergantung musim adalah dengan teknik kultur jaringan. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk melakukan mikropropagasi *R. akane* pada media MS dengan perlakuan sitokinin Kinetin atau BAP konsentrasi 0; 0,5; 1; dan 2 ppm menggunakan eksplan tunas pucuk dan buku (nodus). Eksplan yang digunakan adalah pucuk 1 tunas dan pucuk 2 tunas yaitu tunas yang bercabang dari satu buku, dan eksplan buku tunggal. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa 8 minggu setelah tanam, tunas tertinggi dihasilkan dari media MS tanpa sitokinin dari eksplan pucuk 1 tunas yaitu 8,36 cm, jumlah total daun tertinggi dihasilkan dari media MS dengan penambahan 0,5 ppm Kinetin sebesar 45,86 helai, jumlah ruas dari tunas tertinggi diperoleh dari eksplan pucuk 2 tunas pada media MS dengan penambahan 0,5 ppm BAP yaitu 4,72 ruas, jumlah tunas lateral tertinggi diperoleh dari eksplan pucuk 2 tunas yang ditanam pada media MS yaitu 4,57 tunas, dan jumlah akar terbanyak diperoleh dari eksplan pucuk 1 tunas yang ditanam pada media MS yaitu sebesar 9,14. Daya hidup di rumah kaca planlet dari media MS dengan penambahan BAP (83,33%) lebih tinggi dibandingkan dengan planlet yang berasal dari media MS dengan penambahan Kinetin (60,42%).

Kata Kunci: *Rubia akane* Nakai, BAP, *in vitro*, kinetin, sitokinin, mikropropagasi.

PENDAHULUAN

Rubia akane Nakai, mempunyai nama umum *Madder* merupakan tanaman tahunan dari Famili Rubiaceae. Tanaman ini sejak dahulu biasa digunakan sebagai pewarna alami di Asia (Singh & Chughan *et al.* 2004; Park & Lee, 2009). Pigmen antraquinon seperti alizarin dan purpurin yang terkandung dalam akar dari *R. akane* merupakan salah satu kelompok terpenting untuk memproduksi pewarna alami (Shin, 1989). Selain itu, antraquinon juga dilaporkan dapat berfungsi sebagai anti-kanker (Son *et al.* 2008), antimalaria (Bringmann *et al.* 2008), antioksidan (Galindo *et al.* 2008), antimikroba (Xiang *et al.*

2008), dan antijamur (Singh *et al.* 2006).

Tanaman ini berkembangbiak dengan biji dan stek. Oleh karena akar merupakan bagian tanaman yang sering dimanfaatkan, maka diperlukan cara perkembangbiakan alternatif yang lebih cepat antara lain melalui kultur jaringan. Penggunaan teknologi kultur jaringan tanaman untuk propagasi komersial spesies tanaman dan untuk produksi komponen bioaktif telah menjadi industri yang menguntungkan (Yancheva & Kondakova, 2018). Efisiensi produksi metabolit sekunder dengan teknik kultur jaringan telah terbukti karena memiliki sifat genetik, kestabilan biokimia, kecepatan laju pertumbuhan, dan kemampuan dalam sintesis

komponen alami yang dapat dibandingkan dengan teknik perbanyakan tanaman secara *in vivo* (Guillon *et al.* 2006).

Penelitian tentang perbanyakan secara *in vitro* tanaman *R. akane* belum banyak dipublikasikan. Shin (1989) melaporkan biosintesis pigmen antrakuinon dari kalus *R. akane*. Oleh karena tanaman ini menghasilkan zat pewarna alami terutama pada bagian akarnya, beberapa penelitian tentang kultur akar telah dilakukan. Park & Lee (2009) dan Park *et al.* (2009) meneliti pengaruh pemberian auksin IBA, IAA dan NAA yang ditambahkan pada media dasar MS, SH dan B5 terhadap pertumbuhan dan produksi alizarin dan purpurin pada kultur akar rambut *R. akane*. Lee *et al.* (2010) mempublikasikan penelitian tentang kultur akar rambut hasil transformasi dengan beberapa galur *Agrobacterium rhizogenes* menggunakan media MS untuk produksi antrakuinon alizarin dan purpurin secara *in vitro*. Kriopreservasi kultur akar rambut telah dilakukan oleh Kim *et al.* (2012) dan Salma *et al.* (2013). Untuk tujuan preservasi, kultur akar *R. akane* telah dilakukan enkapsulasi (Shin *et al.* 2014). Produksi antrakuinon secara *in vitro* menggunakan kultur akar juga dilakukan terhadap tanaman dari genus yang sama yaitu *Rubia tinctorium* (Bicer *et al.* 2017).

Mikropropagasi pada *R. akane* belum banyak dilaporkan. Beberapa penelitian mikropropagasi telah dilakukan pada tanaman dari genus yang sama antara lain pada *R. cordifolia* menggunakan eksplan buku yang dikulturkan pada media MS dengan penambahan sitokinin (Radha *et al.* 2011) dan peningkatan multiplikasi dari tunas aksilar menggunakan media MS dengan penambahan tidiazuron (Ghatge *et al.* 2011). Regenerasi tidak langsung secara *in vitro* pada *R. cordifolia* dilaporkan oleh Khadke *et al.* (2013). Pada jenis tanaman yang sama, Vivekanandan *et al.* (2014) juga melakukan regenerasi *in vitro* dan meneliti evaluasi stabilitas genetiknya. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk melakukan mikropropagasi *R. akane* pada media MS dengan perlakuan sitokinin Kinetin dan BAP konsentrasi 0; 0,5; 1; dan 2 ppm menggunakan eksplan tunas pucuk dan buku (nodus).

BAHAN DAN CARA KERJA

Eksplan yang digunakan pada penelitian ini adalah tunas *in vitro* *R. akane* umur 2 bulan yang ditanam pada media MS (Murashige & Skoog

1962) tanpa penambahan zat pengatur tumbuh. Media yang digunakan untuk perlakuan adalah media MS dengan penambahan sitokinin Kinetin atau BAP dengan konsentrasi 0; 0,5; 1 dan 2 ppm. Media dipadatkan dengan agar Gelzan (TM Caisson labs) sebanyak 3 g/l, pH media diatur menjadi 5,8 kemudian media disterilisasi menggunakan otoklaf pada tekanan 15 psi dan suhu 121°C selama 15 menit. Tiga macam eksplan yang digunakan berupa pucuk 1 tunas (tunas pucuk tunggal), pucuk 2 tunas (dua tunas yang muncul pada satu pucuk), dan buku tunggal. Eksplan yang telah ditanam pada media perlakuan kemudian diinkubasikan di dalam ruang kultur pada suhu $25 \pm 2^\circ\text{C}$, dengan intensitas pencahayaan sekitar 900 lux secara kontinyu.

Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap dengan variabel pengamatan berupa tinggi tanaman, jumlah total daun, jumlah ruas tunas tertinggi, jumlah tunas lateral, dan jumlah akar yang diamati setiap minggu selama 8 minggu setelah tanam. Tiap botol kultur ditanami dengan 4 eksplan. Masing-masing perlakuan media mempunyai 16 ulangan. Uji statistik dilakukan dengan menggunakan *Multiple Comparison Test* dengan *Duncan's multiple range test* ($p=0,05$).

Aklimatisasi dilakukan terhadap planlet hasil perlakuan yang telah berumur 8 minggu setelah tanam sebanyak 8 planlet untuk masing-masing perlakuan. Sebelum aklimatisasi, dilakukan *hardening* dengan cara memindahkan botol berisi planlet dari ruang kultur ke rumah kaca yang ternaungi selama 3 hari. Aklimatisasi dilakukan dengan cara mengeluarkan planlet yang sudah berakar dari botolnya dengan cara menambahkan sedikit air ke dalam botol, kemudian dikocok perlahan dengan menggunakan pinset sehingga planlet terlepas dari media agar. Planlet kemudian dikeluarkan dari botol, dicuci dengan air hingga bersih sampai tidak terdapat media yang tertinggal pada akar planlet. Planlet kemudian ditanam pada media aklimatisasi yaitu campuran tanah, *cocopeat* dan sekam bakar dengan perbandingan 2:1:1. Bak berisi media yang telah ditanami planlet tersebut diberi label, kemudian disungkup dengan menggunakan plastik transparan dan diletakkan di tempat teduh di dalam rumah kaca selama dua minggu. Setelah itu, sungkup plastik dibuka

secara bertahap dan tanaman diletakkan di tempat yang mendapat sinar matahari yang cukup.

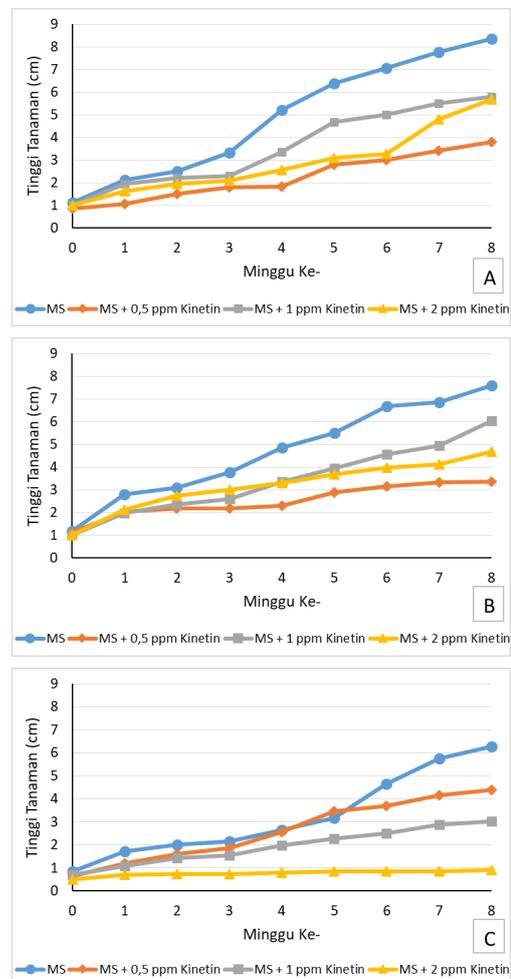
HASIL

Pertumbuhan tinggi tunas *R. akane* dengan perlakuan penambahan Kinetin dan BAP umur 0-8 minggu terdapat pada Gambar 1 dan 2. Penambahan tinggi tunas mulai terlihat setelah minggu pertama, namun pertumbuhannya masih lambat. Pada ketiga jenis eksplan yang digunakan, media MS tanpa penambahan Kinetin mempunyai pertumbuhan yang lebih tinggi. Pada eksplan pucuk 1 tunas, pada minggu ke-4 pertumbuhan tinggi tunas pada media dengan penambahan 1 ppm Kinetin lebih tinggi dibandingkan dengan tunas pada media dengan penambahan 0,5 dan 2 ppm Kinetin, namun pada minggu ke-8 tinggi tunas pada media dengan 1 ppm Kinetin hampir sama dengan tinggi tunas pada media dengan penambahan 2 ppm kinetin. Pertumbuhan tinggi tunas paling lambat diperoleh pada media dengan penambahan 0,5 ppm Kinetin (Gambar 1A). Hal serupa juga terdapat pada eksplan pucuk 2 tunas. Sampai dengan minggu ke-2 pertumbuhan tinggi tunas masih belum banyak berbeda, namun pada media MS dengan penambahan 0,5 ppm Kinetin, pertumbuhan tinggi tunas terjadi paling lambat dibandingkan dengan media lainnya (Gambar 1B). Hal yang berbeda terjadi pada eksplan buku, penambahan Kinetin dengan konsentrasi tertinggi yaitu 2 ppm menyebabkan pertumbuhan tinggi tunas paling lambat. Penambahan Kinetin 0,5 ppm menyebabkan peningkatan tinggi tanaman, namun setelah minggu ke-6, pertumbuhan tinggi tunas dari eksplan buku yang dikulturkan pada media tanpa Kinetin terlihat paling cepat (Gambar 1C).

Pada perlakuan BAP, pertumbuhan tinggi tunas paling cepat dari eksplan pucuk 1 tunas dan buku terdapat pada media MS tanpa BAP, yang terjadi mulai minggu ke-4 hingga minggu ke-8 (Gambar 2A dan 2C). Pada eksplan 2 tunas, pertumbuhan tinggi tunas mulai awal tanam hingga minggu ke-3 pada semua media tidak berbeda. Akan tetapi, mulai minggu ke-4 hingga minggu ke-8 pertumbuhan tunas pada media MS tanpa BAP dan yang mengandung 0,5 ppm BAP tidak berbeda, lebih tinggi dibandingkan

pada eksplan yang dikulturkan pada media lainnya (Gambar 2B). Pada media MS tanpa BAP dan yang mengandung 0,5 ppm BAP pertumbuhan eksplan buku tertinggi mulai terlihat pada minggu ke-4 hingga minggu ke-8. Peningkatan konsentrasi BAP menurunkan pertumbuhan tinggi tunas (Gambar 2C).

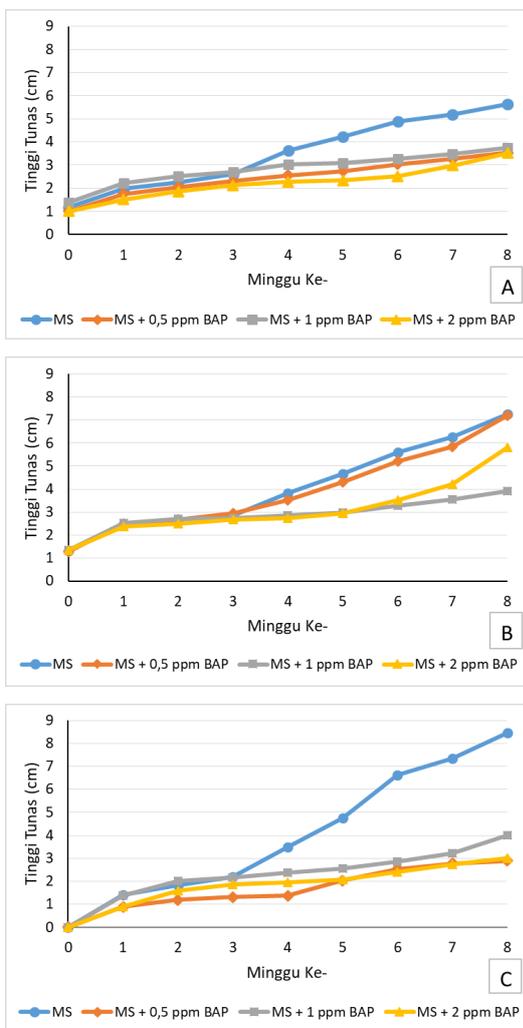
Jumlah daun *R. akane* dari eksplan pucuk 1 tunas pada semua media MS dengan atau tanpa penambahan Kinetin mempunyai pertumbuhan yang tidak berbeda mulai minggu pertama hingga minggu ke-8 (Gambar 3A). Berbeda dengan eksplan pucuk 1 tunas, pertumbuhan jumlah daun pada eksplan 1 pucuk setelah minggu ke-4 hingga minggu ke-8, eksplan yang ditanam pada media tanpa Kinetin mempunyai jumlah daun paling tinggi (Gambar 3B). Pada eksplan buku,



Gambar 1. Rata-rata tinggi tunas *Rubia akane* dari eksplan pucuk 1 tunas (A), pucuk 2 tunas (B) dan buku (C) umur 0-8 MST pada media MS dengan penambahan 0; 0,5; 1 dan 2 ppm Kinetin.

mulai minggu ke-2 terdapat perbedaan jumlah daun. Jumlah daun pada media MS tanpa dan dengan Kinetin 0,5 ppm hampir sama hingga minggu ke-8, sedangkan pada media yang mengandung 2 ppm Kinetin pertumbuhannya paling lambat (Gambar 3C). Pada media MS yang mengandung BAP, baik eksplan pucuk 1 tunas, 2 tunas maupun buku mempunyai pola pertumbuhan serupa dari sejak tanam sampai dengan minggu ke-8. Pertumbuhan jumlah daun tertinggi terdapat pada eksplan pucuk 2 tunas (Gambar 4).

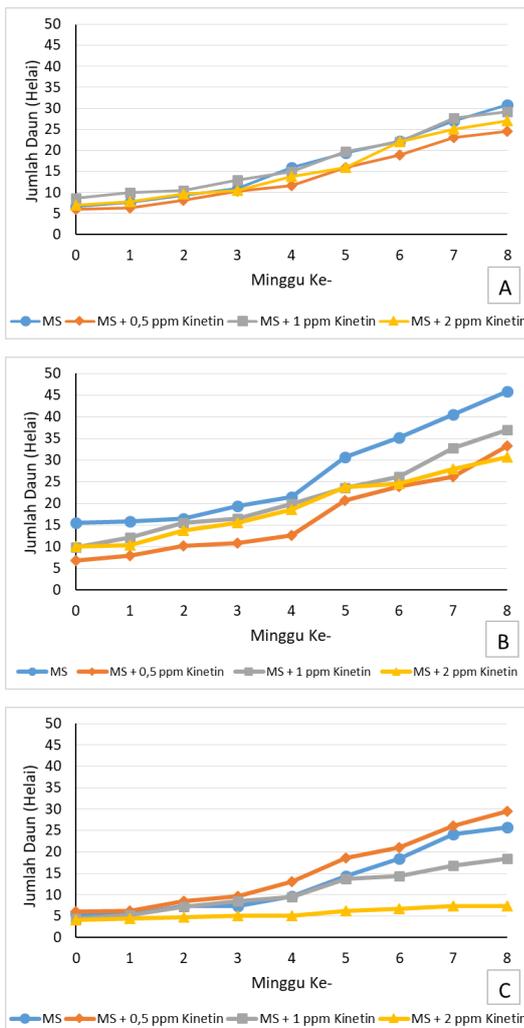
Pola pertumbuhan jumlah ruas tunas *R. akane* pada media MS dengan penambahan Kinetin umur 0-8 minggu terdapat pada Gambar



Gambar 2. Rata-rata tinggi tunas *Rubia akane* dari eksplan pucuk 1 tunas (A), pucuk 2 tunas (B) dan buku (C) umur 0-8 MST pada media MS dengan penambahan 0; 0,5; 1 dan 2 ppm BAP.

5. Pola pertumbuhan ruas dari eksplan pucuk 1 tunas (Gambar 5A) dan pucuk 2 tunas (Gambar 5B) masih meningkat dari awal penanaman hingga minggu ke-8. Pada media MS, mulai minggu ke-4 dan ke-5 eksplan pucuk 1 tunas dan 2 tunas mempunyai jumlah ruas tertinggi hingga minggu ke-8 (Gambar 5A dan B), sedangkan pada eksplan buku, jumlah ruas tertinggi pada media ini terlihat pada minggu ke-8 (Gambar 5C). Eksplan buku yang ditanam pada media MS yang mengandung 2 ppm Kinetin mempunyai pertumbuhan lambat mulai awal penanaman hingga minggu ke-8 (Gambar 5C).

Pertumbuhan jumlah ruas pada eksplan *R. akane* yang ditanam pada media MS tanpa

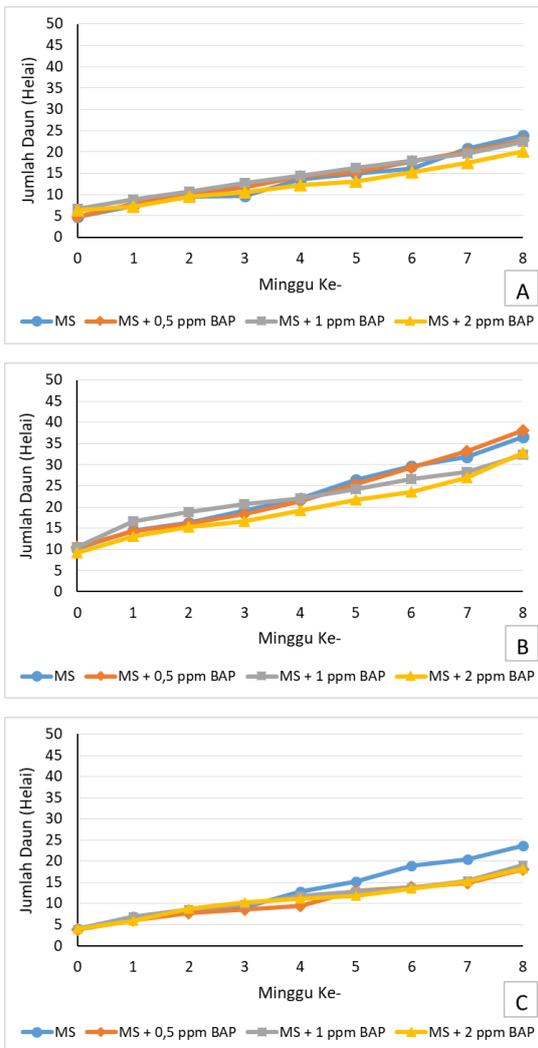


Gambar 3. Rata-rata jumlah total daun *Rubia akane* dari eksplan pucuk 1 tunas (A), pucuk 2 tunas (B) dan buku (C) umur 0-8 MST pada media MS dengan penambahan 0; 0,5; 1 dan 2 ppm Kinetin.

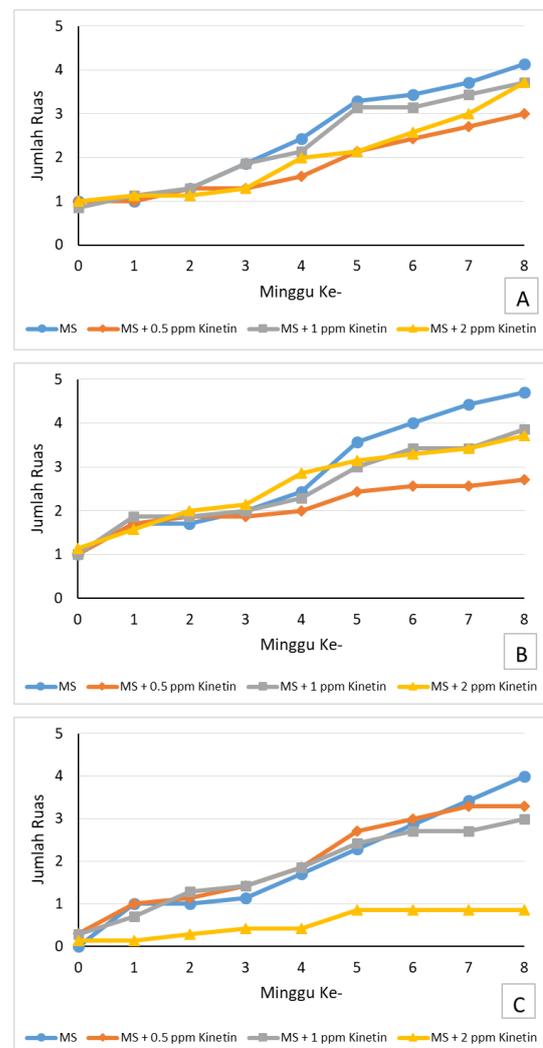
penambahan zat pengatur tumbuh mulai mengalami peningkatan mulai dari minggu pertama hingga minggu terakhir pengamatan (Gambar 6). Eksplan pucuk 1 tunas pada awal penanaman hingga minggu ke-2 mempunyai pertumbuhan yang sama, mulai minggu ke-2 pucuk 1 tunas pada media MS tanpa BAP mempunyai jumlah ruas tertinggi hingga minggu ke-8 (Gambar 6A). Pada eksplan pucuk 2 tunas, pertumbuhan jumlah ruas sama pada minggu pertama hingga minggu ke-3, selanjutnya pertumbuhan ruas pada media MS tanpa dan dengan penambahan 0,5 ppm BAP sama dengan pada media MS tanpa BAP hingga minggu ke-8, lebih tinggi dibandingkan dengan jumlah tunas pada media

MS dengan penambahan 1 dan 2 ppm BAP (Gambar 6B). Mulai minggu ke-4 jumlah ruas dari eksplan buku tertinggi hingga minggu ke-8 diperoleh dari media MS tanpa BAP. Jumlah ruas pada media dengan penambahan BAP konsentrasi 0,5-2 ppm terlihat sama mulai awal penanaman hingga minggu ke-8 pengamatan (Gambar 6C).

Jumlah tunas lateral *R. akane* dari eksplan pucuk 1 tunas, pucuk 2 tunas dan buku umur 0-8 MST pada media MS dengan penambahan 0; 0,5; 1 dan 2 ppm Kinetin tertera pada Gambar 7. Jumlah tunas lateral dari eksplan pucuk 1 tunas mempunyai pola pertumbuhan yang sama hingga minggu ke-5 pada semua media, selanjutnya

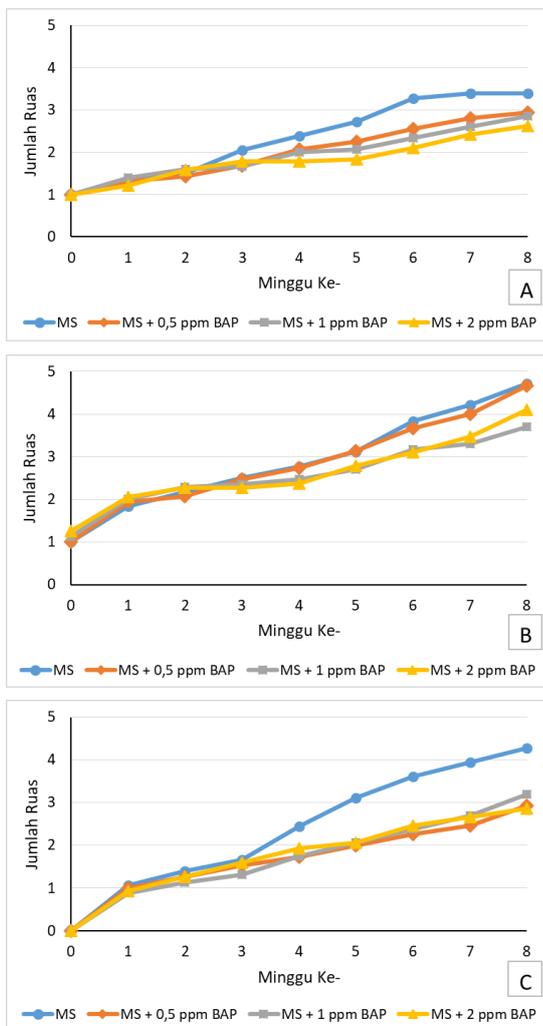


Gambar 4. Rata-rata jumlah daun total *Rubia akane* dari eksplan pucuk 1 tunas (A), pucuk 2 tunas (B) dan buku (C) umur 0-8 MST pada media MS dengan penambahan 0; 0,5; 1 dan 2 ppm BAP.



Gambar 5. Rata-rata jumlah ruas dari tunas tertinggi *Rubia akane* dari eksplan pucuk 1 tunas (A), pucuk 2 tunas (B) dan buku (C) umur 0-8 MST pada media MS dengan penambahan 0; 0,5; 1 dan 2 ppm Kinetin.

pertumbuhan jumlah tunas lateral bervariasi dan pada minggu ke-8 jumlah tunas lateral tertinggi dihasilkan pada media MS dengan penambahan 1 ppm Kinetin (Gambar 7A). Pada eksplan pucuk 2 tunas jumlah tunas lateral meningkat hingga minggu ke-8 kecuali pada media yang mengandung 2 ppm Kinetin yang mempunyai pertumbuhan paling lambat. Mulai minggu ke-5 hingga ke-8 jumlah tunas lateral tertinggi diperoleh pada media tanpa penambahan Kinetin (Gambar 7B). Berbeda dengan eksplan buku, jumlah tunas lateral hingga minggu ke-6 hanya sedikit berbeda, namun selanjutnya hingga minggu ke-8 jumlah tunas lateral tertinggi diperoleh pada media MS dengan penambahan 0,5 ppm Kinetin (Gambar 7C). Tunas lateral terendah dihasilkan dari media



Gambar 6. Rata-rata jumlah ruas dari tunas tertinggi *Rubia akane* dari eksplan pucuk 1 tunas (A), pucuk 2 tunas (B) dan buku (C) umur 0-8 MST pada media MS dengan penambahan 0; 0,5; 1 dan 2 ppm BAP.

MS dengan penambahan 2 ppm Kinetin.

Pada eksplan pucuk 1 tunas, media MS dengan penambahan 1 ppm BAP merupakan media terbaik untuk pertumbuhan jumlah tunas lateral mulai minggu pertama hingga minggu ke-8 (Gambar 8A). Penambahan 0,5 dan 2 ppm BAP menurunkan jumlah tunas lateral. Pola pertumbuhan jumlah tunas lateral dari eksplan pucuk 2 tunas berbeda dengan eksplan pucuk 1 tunas, dan jumlah tertinggi pada minggu ke-8 dicapai oleh eksplan yang ditanam pada media MS yang mengandung 0,5 ppm BAP, terendah pada media MS tanpa BAP (Gambar 8B). Pada eksplan buku, pola pertumbuhan jumlah tunas lateral serupa pada semua media, jumlah tunas lateral tertinggi dihasilkan pada media MS dengan penambahan 0,5 ppm dan 1 ppm BAP dan jumlah tunas lateral terendah dihasilkan dari media MS tanpa penambahan BAP dan dengan penambahan 2 ppm BAP (Gambar 8C).

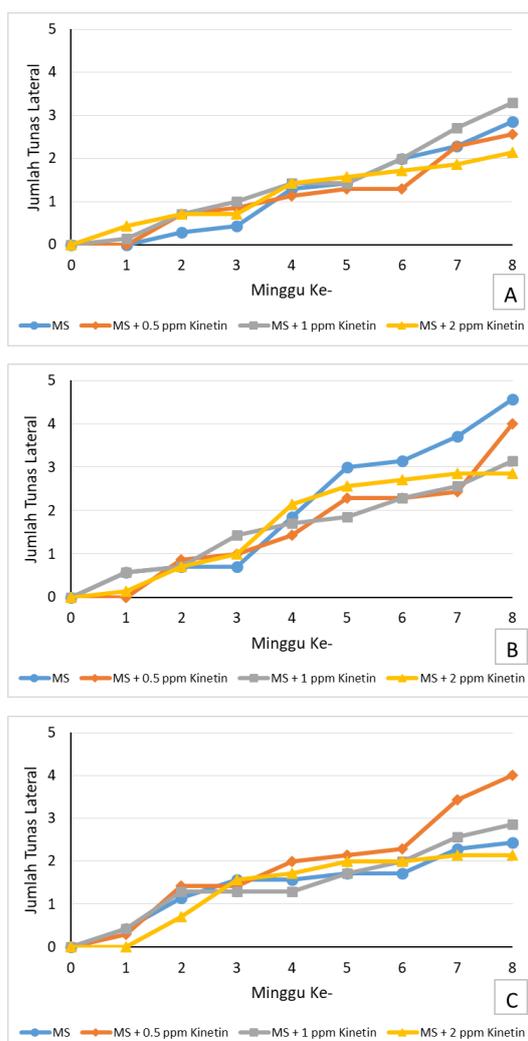
Jumlah akar *R. akane* tertinggi pada eksplan pucuk dengan 1 tunas, mulai minggu ke-2 hingga minggu ke-8 pada media MS tanpa penambahan Kinetin tertinggi dibandingkan pada semua media dengan penambahan Kinetin (Gambar 9A). Pada eksplan pucuk 2 tunas, jumlah akar tertinggi pada media MS tanpa BAP terlihat mulai minggu ke-4, namun pertumbuhannya melambat hingga pada minggu ke-8 jumlahnya sama dengan akar yang ditumbuhkan pada media MS dengan penambahan 0,5 dan 2 ppm Kinetin (Gambar 9B). Pada eksplan buku, pola pertumbuhan jumlah akar pada media MS tanpa dan dengan penambahan 0,5 dan 1 ppm Kinetin serupa hingga minggu ke-8 kecuali eksplan yang ditanam pada media yang mengandung 2 ppm Kinetin mempunyai pertumbuhan paling lambat hingga minggu ke-8 (Gambar 9C). Media MS dengan penambahan BAP menunjukkan pertumbuhan jumlah akar yang rendah mulai awal penanaman hingga minggu ke-8 pada semua jenis eksplan terutama pada eksplan buku (Gambar 10).

Pengaruh pemberian sitokinin (Kinetin dan BAP) dengan konsentrasi 0; 0,5; 1, dan 2 ppm terhadap tinggi tanaman, jumlah total daun, jumlah ruas dari tunas tertinggi, jumlah tunas lateral dan jumlah akar pada umur 8 minggu tertera pada Tabel 1 dan 2. Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan Kinetin maupun BAP berpengaruh terhadap pertumbuhan *R. akane*. Tabel 1 menunjukkan bahwa pada 8 MST, tinggi tunas dan jumlah akar tertinggi diperoleh dari

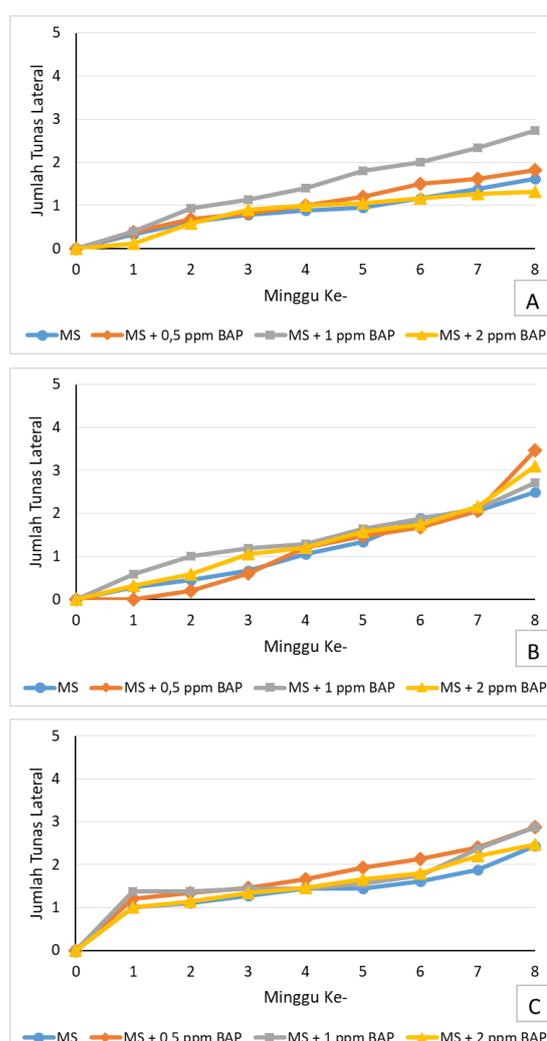
eksplan pucuk 1 tunas yang ditanam pada media MS tanpa kinetin, sedangkan terendah adalah dari eksplan buku pada media MS yang mengandung 2 ppm Kinetin. Jumlah total daun tertinggi diperoleh dari eksplan pucuk 1 tunas pada media MS yang mengandung 0,5 ppm Kinetin, terendah juga pada media MS dengan penambahan 2 ppm Kinetin dari eksplan buku. Jumlah ruas dan jumlah tunas lateral tertinggi diperoleh dari eksplan pucuk 2 tunas pada media MS dengan penambahan 0,5 ppm Kinetin.

Berbeda dengan perlakuan media MS dengan Kinetin, pada perlakuan media MS dengan penambahan BAP, tunas tertinggi dihasilkan pada media MS tanpa dan MS dengan penambahan

0,5 ppm BAP dari eksplan pucuk 2 tunas dan eksplan buku pada media MS berbeda nyata dengan perlakuan lainnya, jumlah daun total tertinggi dihasilkan dari eksplan pucuk 2 tunas pada media MS dengan penambahan 0; 0,5; 1; dan 2 ppm BAP berbeda nyata dengan perlakuan lainnya (Tabel 2). Jumlah ruas tertinggi diperoleh dari eksplan pucuk 2 tunas pada media MS tanpa dan MS dengan penambahan 0,5 ppm BAP, sedangkan jumlah tunas lateral tertinggi diperoleh dari eksplan pucuk 2 tunas yang ditanam pada media MS dengan penambahan 0,5 ppm BAP. Jumlah akar terbanyak diperoleh dari eksplan pucuk 2 tunas yang ditanam pada media MS tanpa BAP. Performa tunas *R. akane* umur 8 MST pada



Gambar 7. Rata-rata jumlah tunas lateral *Rubia akane* dari eksplan pucuk 1 tunas (A), pucuk 2 tunas (B) dan buku (C) umur 0-8 MST pada media MS dengan penambahan 0; 0,5; 1 dan 2 ppm Kinetin.



Gambar 8. Rata-rata jumlah tunas lateral *Rubia akane* dari eksplan pucuk 1 tunas (A), pucuk 2 tunas (B) dan buku (C) umur 0-8 MST pada media MS dengan penambahan 0; 0,5; 1 dan 2 ppm BAP.

media perlakuan MS dengan penambahan 0; 0,5; 1; dan 2 ppm Kinetin tertera pada Gambar 11, sedangkan pada media dengan penambahan BAP tertera pada Gambar 12.

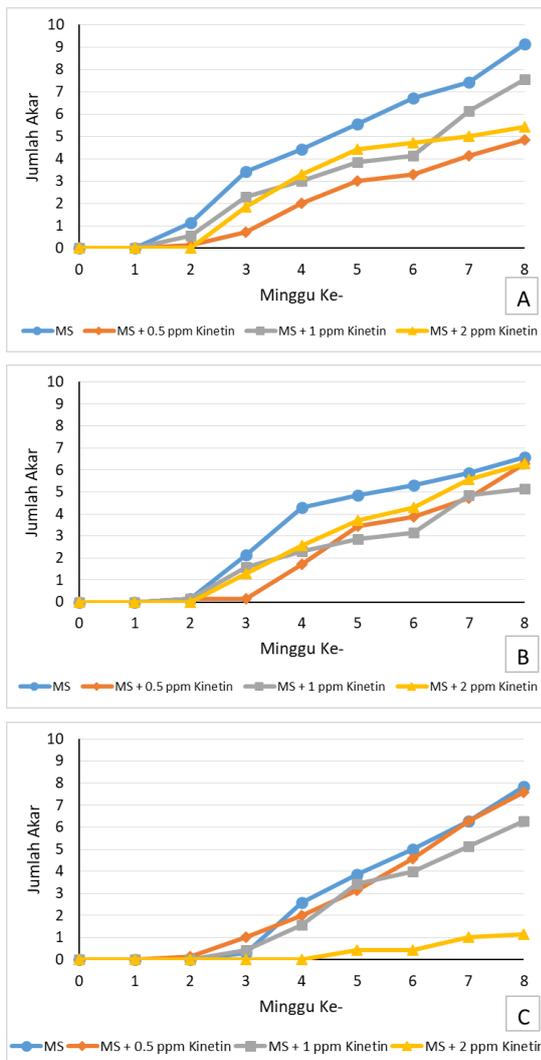
Tingkat keberhasilan aklimatisasi pada planlet *R. akane* beragam (Tabel 3 dan 4). Planlet dengan tingkat keberhasilan tertinggi diperoleh dari eksplan pucuk 2 tunas pada media MS tanpa penambahan zat pengatur tumbuh dan MS dengan penambahan 0,5 ppm BAP dan eksplan buku pada media MS dengan penambahan 0,5 ppm BAP dan 1 ppm BAP. Tingkat keberhasilan aklimatisasi terendah dihasilkan dari ekplan pucuk 1 tunas pada media MS dengan penambahan 0,5 ppm Kinetin dan eksplan buku pada media MS dengan penambahan 2 ppm

Kinetin (Tabel 3). Contoh tanaman hasil aklimatisasi tertera pada Gambar 13.

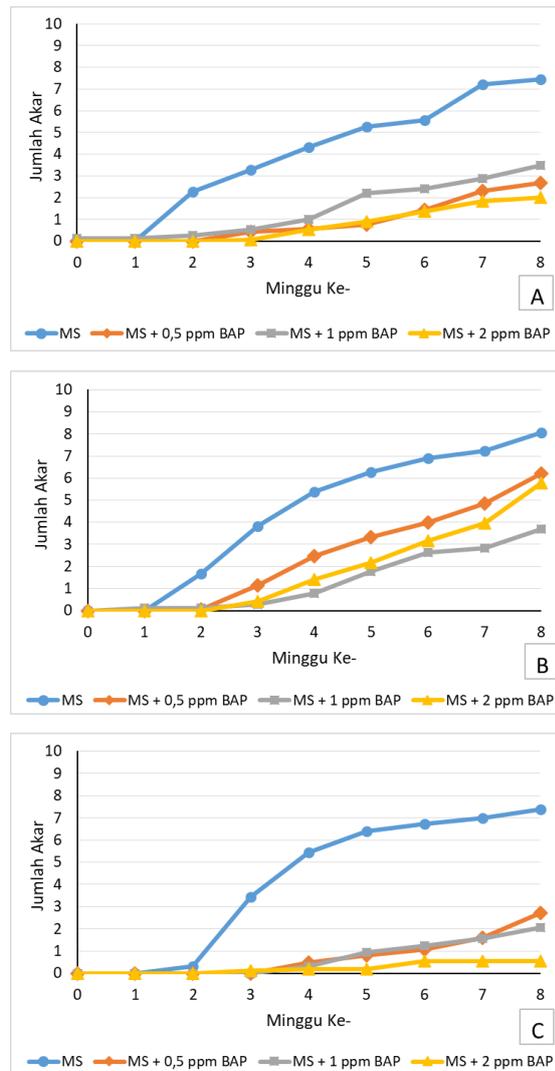
PEMBAHASAN

Terdapat beberapa jenis golongan Sitokinin, yaitu kinetin, zeatin, ribosil dan bensil aminopurin (BAP), 2-iP, Thidiazuron (Hendaryono dan Wijayani, 1994 dalam Shiddiqi, *et al.* 2013). Beberapa macam sitokinin merupakan sitokinin alami (misal : kinetin, zeatin) dan beberapa lainnya sitokinin sintetik yaitu BAP (6-benzilaminopurin) dan 2-iP (Intan, 2008).

Kinetin maupun BAP merupakan jenis



Gambar 9. Rata-rata jumlah akar tunas *Rubia akane* dari eksplan pucuk 1 tunas (A), pucuk 2 tunas (B) dan buku (C) umur 0-8 MST pada media MS dengan penambahan 0; 0,5; 1 dan 2 ppm Kinetin.



Gambar 10. Rata-rata jumlah akar tunas *Rubia akane* dari eksplan pucuk 1 tunas (A), pucuk 2 tunas (B) dan buku (C) umur 0-8 MST pada media MS dengan penambahan 0; 0,5; 1 dan 2 ppm BAP.

Tabel 1. Rata-rata tinggi tanaman, jumlah daun total, jumlah ruas dari tunas tertinggi, jumlah tunas lateral dan jumlah akar tunas *Rubia akane* dari eksplan pucuk 1 tunas, pucuk 2 tunas dan buku umur 8 MST pada media MS dengan penambahan 0; 0,5; 1 dan 2 ppm Kinetin.

Eksplan	Media	Tinggi Tunas (cm)	Jumlah Total Daun (helai)	Jumlah Ruas dari Tunas Tertinggi	Jumlah Tunas Lateral	Jumlah Akar
1 Tunas	MS tanpa Kinetin	8,4 ± 1,01 ^a	30,9 ± 3,32 ^d	4,1 ± 0,46 ^b	2,9 ± 0,41 ^d	9,1 ± 1,26 ^a
	MS + 0,5 ppm Kinetin	3,8 ± 0,40 ^h	45,9 ± 4,39 ^a	3,0 ± 0,29 ^g	2,6 ± 0,33 ^e	4,9 ± 0,71 ^e
	MS + 1 ppm Kinetin	5,8 ± 0,66 ^e	25,7 ± 3,01 ^g	3,7 ± 0,41 ^e	3,3 ± 0,42 ^c	7,6 ± 1,01 ^b
	MS + 2 ppm Kinetin	5,7 ± 0,57 ^e	24,6 ± 2,67 ^g	3,7 ± 0,36 ^c	2,1 ± 0,28 ^f	5,4 ± 0,87 ^d
2 Tunas	MS tanpa Kinetin	7,6 ± 0,82 ^b	33,3 ± 3,54 ^c	4,7 ± 0,51 ^a	4,7 ± 0,62 ^a	6,6 ± 1,01 ^c
	MS + 0,5 ppm Kinetin	3,4 ± 0,28 ⁱ	29,4 ± 3,30 ^e	2,7 ± 0,21 ^h	4,0 ± 0,49 ^b	6,3 ± 0,90 ^c
	MS + 1 ppm Kinetin	6,0 ± 0,61 ^d	29,1 ± 2,92 ^e	3,9 ± 0,36 ^d	3,1 ± 0,39 ^e	5,1 ± 0,75 ^{de}
	MS + 2 ppm Kinetin	4,7 ± 0,43 ^f	37,0 ± 3,49 ^b	3,7 ± 0,34 ^c	2,9 ± 0,45 ^d	6,3 ± 0,93 ^c
Buku	MS tanpa Kinetin	6,3 ± 0,71 ^c	18,4 ± 1,93 ^h	4,0 ± 0,49 ^c	2,4 ± 0,30 ^e	7,9 ± 1,15 ^b
	MS + 0,5 ppm Kinetin	4,4 ± 0,51 ^g	27,0 ± 2,87 ^f	3,3 ± 0,37 ^f	4,0 ± 0,49 ^b	7,6 ± 1,08 ^b
	MS + 1 ppm Kinetin	3,0 ± 0,31 ^j	30,7 ± 2,88 ^d	3,0 ± 0,36 ^g	2,9 ± 0,35 ^d	6,3 ± 0,93 ^c
	MS + 2 ppm Kinetin	0,9 ± 0,05 ^k	7,4 ± 0,47 ⁱ	0,9 ± 0,12 ⁱ	2,1 ± 0,34 ^f	1,1 ± 0,17 ^f

Keterangan: Angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji jarak berganda Duncan pada $\alpha = 5\%$.

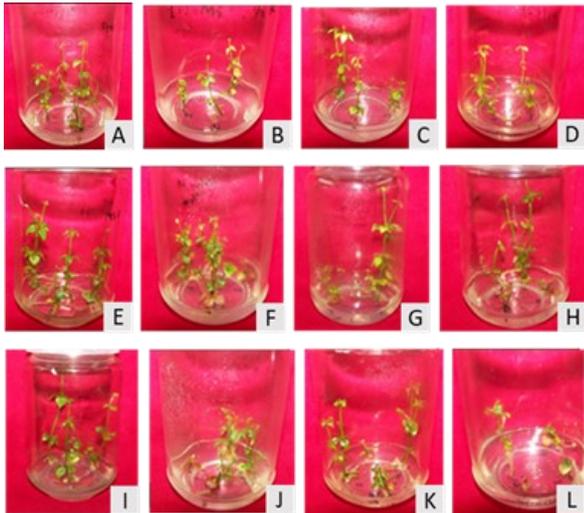
Tabel 2. Rata-rata tinggi tanaman, jumlah daun total, jumlah ruas dari tunas tertinggi, jumlah tunas lateral dan jumlah akar tunas *Rubia akane* dari eksplan pucuk 1 tunas, pucuk 2 tunas dan buku umur 8 MST pada media MS dengan penambahan 0; 0,5; 1 dan 2 ppm BAP.

Eksplan	Media	Tinggi Tunas (cm)	Jumlah Total Daun (helai)	Jumlah Ruas dari Tunas Tertinggi	Jumlah Tunas Lateral	Jumlah Akar
1 Tunas	MS tanpa BAP	5,6 ± 0,55 ^b	23,8 ± 1,64 ^b	3,4 ± 0,18 ^{cd}	1,6 ± 0,23 ^{de}	7,4 ± 0,74 ^{ab}
	MS + 0,5 ppm BAP	3,5 ± 0,26 ^c	22,8 ± 2,40 ^b	2,9 ± 0,17 ^{de}	1,8 ± 0,23 ^{cde}	2,7 ± 0,33 ^c
	MS + 1 ppm BAP	3,8 ± 0,45 ^c	22,3 ± 2,35 ^b	2,9 ± 0,22 ^{de}	2,7 ± 0,25 ^{abc}	3,5 ± 0,58 ^c
	MS + 2 ppm BAP	3,5 ± 0,23 ^c	20,2 ± 1,66 ^b	2,6 ± 0,21 ^e	1,3 ± 0,17 ^e	2,0 ± 0,40 ^{cd}
2 Tunas	MS tanpa BAP	7,3 ± 0,60 ^a	36,6 ± 2,38 ^a	4,7 ± 0,18 ^a	2,5 ± 0,35 ^{abcd}	8,1 ± 0,60 ^a
	MS + 0,5 ppm BAP	7,2 ± 0,76 ^a	38,1 ± 2,98 ^a	4,7 ± 0,23 ^a	3,5 ± 0,40 ^a	6,2 ± 1,07 ^{ab}
	MS + 1 ppm BAP	3,9 ± 0,38 ^c	32,3 ± 3,07 ^a	3,7 ± 0,32 ^{bc}	2,7 ± 0,44 ^{abc}	3,7 ± 0,98 ^c
	MS + 2 ppm BAP	5,8 ± 0,62 ^b	32,8 ± 2,53 ^a	4,1 ± 0,20 ^{ab}	3,1 ± 0,40 ^{ab}	5,8 ± 0,84 ^b
Buku	MS tanpa BAP	8,5 ± 0,54 ^a	23,7 ± 1,32 ^b	4,3 ± 0,16 ^{ab}	2,4 ± 0,23 ^{bcd}	7,4 ± 0,64 ^{ab}
	MS + 0,5 ppm BAP	2,9 ± 0,22 ^c	18,0 ± 1,03 ^b	2,9 ± 0,18 ^{de}	2,9 ± 0,27 ^{ab}	2,7 ± 0,42 ^c
	MS + 1 ppm BAP	4,0 ± 0,35 ^c	19,1 ± 1,25 ^b	3,2 ± 0,16 ^{cde}	2,9 ± 0,20 ^{ab}	2,1 ± 0,30 ^{cd}
	MS + 2 ppm BAP	3,0 ± 0,30 ^c	18,2 ± 1,35 ^b	2,9 ± 0,24 ^{de}	2,5 ± 0,27 ^{bcd}	0,5 ± 0,24 ^d

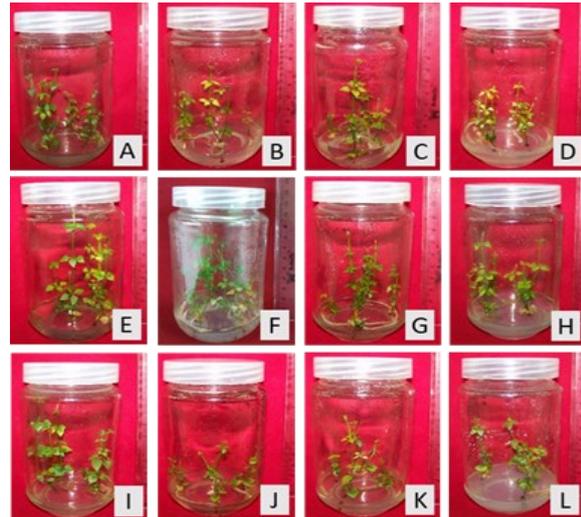
Keterangan: Angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji jarak berganda Duncan pada $\alpha = 5\%$.

sitokinin yang sangat umum dipergunakan untuk mikropropagasi berbagai jenis tanaman. Kedua jenis sitokinin ini murah dan mudah diperoleh. Sitokinin adalah senyawa kimia yang dapat meningkatkan pembelahan sel pada jaringan tanaman serta mengatur pertumbuhan dan perkembangan tanaman, mempercepat pemanjangan sel, diferensiasi sel, serta pembentukan organ

(Zulkarnain, 2009). Sitokinin juga berperan sebagai *inducer* sitokinesis, terlibat dalam beragam proses biologi, *senescence*, dominasi *apical*, proliferasi akar serta *philotaksis* (Kudo *et al.* 2010). Selain itu, Hortman & Kister (1995) dan Wattimena (1998) mengatakan bahwa sitokinin (BAP) berpengaruh terhadap metabolisme sel, pembelahan sel, merangsang sel, mendorong pembentukan buah



Gambar 11. Tunas *Rubia akane* pada Media Perlakuan (8 MST). Tunas berasal dari eksplan pucuk 1 tunas pada media MS tanpa Kinetin (A); MS + 0,5 ppm Kinetin (B); MS + 1 ppm Kinetin (C); MS + 2 ppm Kinetin (D); dari eksplan pucuk 2 tunas pada media MS tanpa Kinetin (E); MS + 0,5 ppm Kinetin (F); MS + 1 ppm Kinetin (G); MS + 2 ppm Kinetin (H); dari eksplan buku pada media MS tanpa Kinetin (I); MS + 0,5 ppm Kinetin (J); MS + 1 ppm Kinetin (K); MS + 2 ppm Kinetin (L).



Gambar 12. Tunas *Rubia akane* pada Media Perlakuan (8 MST). Tunas berasal dari eksplan pucuk 1 tunas pada media MS tanpa BAP (A); MS + 0,5 ppm BAP (B); MS + 1 ppm BAP (C); MS + 2 ppm BAP (D); dari eksplan pucuk 2 tunas pada media MS tanpa BAP (E); MS + 0,5 ppm BAP (F); MS + 1 ppm BAP (G); MS + 2 ppm BAP (H); dari eksplan buku pada media MS tanpa BAP (I); MS + 0,5 ppm BAP (J); MS + 1 ppm BAP (K); MS + 2 ppm BAP (L).



Gambar 13. Tanaman *Rubia akane* hasil aklimatisasi di pembibitan

Tabel 3. Persentase keberhasilan aklimatisasi tanaman *Rubia akane* dari media MS dengan penambahan Kinetin umur 6 minggu setelah aklimatisasi.

Media	Persentase hidup (%) tanaman dari jenis eksplan		
	1 Tunas	2 Tunas	Buku
MS	87,5	100,0	75,0
MS + 0,5 ppm kinetin	25,0	87,5	50,0
MS + 1 ppm kinetin	50,0	62,5	50,0
MS + 2 ppm kinetin	50,0	62,5	50,0
MS	87,5	100,0	75,0
MS + 0,5 ppm BAP	62,5	100,0	100,0
MS + 1 ppm BAP	87,5	50,0	100,0
MS + 2 ppm BAP	75,0	75,0	87,5

dan biji, serta mendorong inisiasi tunas lateral.

Pada konsentrasi rendah yaitu 0,5 ppm, Kinetin dan BAP yang ditambahkan pada media MS mampu meningkatkan pembentukan tunas lateral pada *R. akane*. Mikropropagasi jenis tanaman ini belum banyak dilaporkan, namun pada genus yang sama yaitu *R. cordifolia*, memerlukan penambahan BAP dengan konsentrasi lebih tinggi yaitu 1 ppm untuk mendapatkan jumlah tunas majemuk yang optimal (Radha *et al.* 2011). Pada jenis ini perakaran memerlukan 1 ppm IBA atau 1 ppm IAA. Pada *R. akane* tidak diperlukan penambahan auksin untuk perakaran. Pada *R. cordifolia*, eksplan buku utuh maupun dibelah menjadi dua merupakan eksplan yang lebih baik dibandingkan dengan tunas pucuk (Radha *et al.* 2011), sedangkan pada penelitian ini, *R. akane* eksplan buku maupun pucuk dengan 2 tunas terbaik untuk pembentukan tunas lateral.

Mekanisme kerja sitokinin sangat dipengaruhi oleh konsentrasi auksin dalam tubuh tanaman (Santoso, 2013). Konsentrasi optimal untuk pemberian zat pengatur tumbuh yang mampu mendukung proses pertumbuhan tunas secara *in vitro* berbeda antara satu spesies tanaman dan kultivarnya. Jenis dan konsentrasi zat pengatur tumbuh yang efektif

untuk suatu spesies dan kultivar tanaman tertentu akan memberikan respon yang berbeda untuk spesies dan kultivar tanaman lainnya (Poudel *et al.* 2005). Pada kultur tunas *Rubia akane* pemberian Kinetin pada media Murashige and Skoog (MS) yaitu 2 ppm mampu memberikan respon yang optimal terhadap jumlah tunas dari eksplan pucuk dengan 1 tunas dan 2 tunas.

Bhojwani & Razdan (1996), menyatakan bahwa apabila ketersediaan sitokinin di dalam media kultur terlalu tinggi maka pembelahan sel pada jaringan yang dikulturkan menjadi terhambat. Akan tetapi apabila jaringan tersebut disubkulturkan pada medium dengan kandungan sitokinin yang optimal maka pembelahan sel dapat berlangsung lebih cepat dan pertumbuhan planlet dapat berlangsung optimal. Daisy *et al.* (2007) menyatakan bahwa zat pengatur tumbuh diperlukan sebagai komponen medium bagi pertumbuhan dan diferensiasi. Tanpa penambahan zat pengatur tumbuh dalam medium, pertumbuhan kultur sangat terhambat bahkan mungkin tidak tumbuh sama sekali. Pembentukan organ-organ ditentukan oleh penggunaan yang tepat dari zat pengatur tumbuh tersebut. Jumlah akar tertinggi pada semua jenis eksplan yang digunakan diperoleh pada media MS tanpa penambahan Kinetin ataupun BAP. Hal ini sesuai karena induksi perakaran dipengaruhi oleh auksin bukan oleh sitokinin.

Mikropropagasi *R. akane* menggunakan eksplan tunas pucuk maupun buku merupakan salah satu metode cepat untuk perbanyakan. Protokol ini dapat dikembangkan lebih lanjut untuk mendapatkan tunas majemuk yang lebih banyak seperti dilakukan oleh (Ghatge *et al.* 2011) menggunakan tidiazuron pada *R. cordifolia*. Selain itu protokol ini juga dapat dikembangkan untuk penelitian regenerasi akar rambut menjadi tanaman lengkap untuk penyediaan bibit seperti yang dilakukan oleh Khadke *et al.* (2013) dan Vivekanandan *et al.* (2014) juga pada *R. cordifolia*.

KESIMPULAN

Mikropropagasi tanaman *Rubia akane* dari tiga jenis eksplan berbeda yaitu pucuk 1 dan 2 tunas serta buku tunggal berhasil dilakukan pada media MS dengan penambahan sitokinin Kinetin dan BAP. Pertumbuhan tinggi tunas terbaik diperoleh pada

media MS tanpa sitokinin pada semua jenis eksplan. Media MS yang mengandung 0,5 ppm Kinetin merupakan media terbaik untuk pertumbuhan jumlah daun dengan eksplan buku dan pucuk 1 tunas. Media terbaik untuk pembentukan tunas lateral adalah MS yang mengandung 0,5 ppm kinetin dengan eksplan buku, dan MS yang mengandung 0,5 ppm BAP dengan eksplan pucuk 2 tunas. Media MS tanpa Kinetin maupun BAP terbaik untuk perakaran. Daya tumbuh planlet sangat tinggi dari hampir semua media perlakuan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Lutvinda Ismanjani, Ika Ariza Kusumawati dan Alifia Rahma Andarini yang telah membantu dalam pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Biçer, PO., D. Tunhan, OA., Aşçı, & NG. Baydar. 2017. Effects of methyl jasmonate and caffeic acid applications on secondary metabolite production in Madder (*Rubia tinctorum*) root cultures. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*. 51(3): 508-512.
- Bringmann, G., J. Mutanyatta-Comar, M. Knauer, & BM. Abegaz. 2008. Knipholone and related 4-phenylanthraquinones: structurally, pharmacologically, and biosynthetically remarkable natural products. *Nat. Prod. Rep.* 25:696-718.
- Bhojwani, SS. & MK. Razdan. 1996. *Plant Tissue Culture: Theory and Practice*, a Revised Edition. Elsevier.
- Daisy P., NA. Rayan, & D. Rajathi. 2007. Hypoglycemic and other related effects of *Elephantopus scaber* extracts on alloxan induced diabetic rats. *Journal Biology of Science*. 7:433-437.
- Galindo, F., N. Kabir, J. Gavrilovic, & DA. Russell. 2008. Spectroscopic studies of 1,2-diaminoanthraquinone (DAQ) as a fluorescent probe for the imaging of nitric oxide in living cells. *Photochem. Photobiol. Sci.* 7: 126-130.
- Ghatge, S., K. Subhash & D. Ghansham. 2011. An improved plant regeneration system for high frequency multiplication of *Rubia*

- cordifolia* L.: A rare Medicinal Plant. *Asian Journal of Biotechnology*, 3(4): 397-405.
- Guillon, S., J. Tremouillaux-Guiller, PK. Pati, M. Rideau, & P. Gantet. 2006. Harnessing the potential of hairy roots: dawn of a new era. *Trends Biotechnology* 24: 403-409 p.
- Intan, RDA. 2008. *Peranan dan Fungsi fitohormon Bagi Pertumbuhan Tanaman*. Fakultas Pertanian. Universitas Padjajaran. 43 hal.
- Khadke, S., S. Rani, V. Awad, N. Meti, E. Singh, A. Kuvalekar, & A. Harsulkar. 2013. An improved protocol for *in vitro* regeneration of *Rubia cordifolia* L via organogenesis. *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences*. 3(4): 61-69.
- Kim, H-H. EV. Popova, DJ. Shin, CH. Bae, HJ. Baek, SU. Park & F. Engelmann. 2012. Development of a droplet-vitrification protocol for cryopreservation of *Rubia Akane* (Nakai) hairy roots using a systematic approach. *CryoLetters* 33(6): 506-517.
- Kudo T, T. Kiba, & H. Sakakibara. 2010. Metabolism and long-distance translocation of cytokinins. *Journal of Integrated Plant Biology*. 52 (1):53-60.
- Lee, SY., SG. Kim, WS. Song, YK. Kim, NI. Park, & SU. Park. 2010. Influence of different strains of *Agrobacterium rhizogenes* on hairy root induction and production of alizarin and purpurin in *Rubia akane* Nakai. *Romanian Biotechnological Letters*. 15(4): 5405-5409.
- Murashige, T. & F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco cultures. *Physiologia Plantarum*. 15(3): 473-497
- Park, SU. & SY Lee. 2009. Anthraquinone production by hairy root culture of *Rubia Akane* Nakai: Influence of media and auxin treatment. *Scientific Research and Essay*. 4 (7) : 690-693.
- Park, SU., YK. Kim, & SY. Lee. 2009. Establishment of hairy root culture of *Rubia akane* Nakai for alizarin and purpurin production. *Scientific Research and Essays*. 4, 94-97 p.
- Poudel PR, Kataoka I, Mochioka R. 2005. Effect of plant growth regulators on *in vitro* propagation of *Vitis ficifolia* var. *ganebu* and its interspecific hybrid grape. *Asian Journal of Plant Science*. 4(5): 466-471.
- Radha, RK., SR. Shereena, K. Divya, PN. Krishnan & S. Seeni. 2011. *In Vitro* propagation of *Rubia cordifolia* Linn., A medicinal plant of the Western Ghats. *International Journal of Botany*. 7 (1) : 90-96.
- Salma, M., I. Engelmann-Sylvestre, M. Collin, J. Escoute, M. Lartaud, JY. Yi, HH. Kim, JL. Verdeil, & F. Engelmann. 2013. Effect of the successive steps of a cryopreservation protocol on the structural integrity of *Rubia akane* Nakai hairy roots. *Protoplasma*. October 2013.
- Santoso, BB. 2013. *Zat Pengatur Tumbuh Dalam Pertumbuhan dan Perkembangan Tanaman*. Universitas Sam Ratulangi.
- Shin, SH. 1989. Studies on the production of anthraquinone derivatives by tissue culture of *Rubia* species. *Archives of Pharmacal Research*, 12, 99-102 p.
- Shin, D-J., HE. Lee, CH. Bae, SU. Park, HN. Kang & HH. Kim. 2014. Development of an encapsulation-vitrification protocol for *Rubia akane* (Nakai) hairy roots: A comparison with nonencapsulation. *Cryo Letters* 35 (5), 377-384.
- Singh, RG., & S.M. Chauhan. 2004. Anthraquinones and other biologically active compounds from the genus *Rubia*. *Chem. Biodivers.*, 1, 1241-1246 p.
- Singh DN, N. Verma, S. Raghuvanshi, PK. Shukla, & DK. Kulshreshtha. 2006. Antifungal anthraquinones from *Saprosma fragrans*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 16: 4512-4514.
- Son JK, Jung SJ, Jung JH, Fang Z, Lee CS, Seo CS, Moon DC, Min BS, Kim MR, Woo MH. 2008. Anticancer constituents from the roots of *Rubia cordifolia* L. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 56: 213-216.
- Vivekanandan, L., AB. Kolar, EE. Raj., N. Sisubalan, & MG. Basha. 2014. *In vitro* regeneration and evaluation of genetic stability of *Rubia cordifolia* L.: An endangered medicinal plant of Pachamalai Hills, Tamil

- Nadu, India. *European Academic Research*. II (7): 9995-10016.
- Wattimena, GA. 1998. *Zat Pengatur Tumbuh Tanaman*. Bogor: PAU Institut Pertanian Bogor.
- Xiang, W., QS. Song, HJ. Zhang, & SP. Guo. 2008. Antimicrobial anthraquinones from *Morinda angustifolia*. *Fitoterapia*. 79: 501-504.
- Yancheva, S. & V. Kondakova. 2018. *Bioprocessing of Plant In Vitro Systems : Plant Tissue Culture Technology: Present and Future Development*. Springer International Publishing AG, part of Springer Nature. Pp: 39 – 63.
- Zulkarnain. 2009. *Kultur Jaringan Tanaman: Solusi Perbanyak Tanaman Budi Daya*. Jakarta : PT. Bumi Aksara.

