

PENINGKATAN PRODUK METABOLIT SEKUNDER PURWOCENG DENGAN PERBANYAKAN AKAR RAMBUT MELALUI KULTUR IN-VITRO

Ireng Darwati

Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat
E-mail : Darwati Kadarso204@gmail.com

Purwoceng (*Pimpinella pruatjan* Molck.) merupakan tanaman endemik Indonesia, akarnya berfungsi sebagai afrodisiak. Purwoceng mengandung berbagai senyawa metabolit sekunder yaitu: turunan kumarin, sterol, saponin dan alkaloid. Teknik kultur in-vitro dapat digunakan untuk memproduksi metabolit sekunder dalam skala industri. Keuntungan menggunakan teknik kultur in-vitro antara lain senyawa sekunder yang dihasilkan dapat diproduksi pada lingkungan yang terkendali, bebas dari deraan lingkungan, bebas dari hama, dapat menghasilkan senyawa spesifik, produksi dapat dilakukan sesuai kebutuhan, kualitas dan produksinya dapat lebih konsisten serta lahan yang dibutuhkan tidak luas, mengurangi upah buruh.

Kata kunci : Metabolit sekunder, purwoceng, in vitro

PENDAHULUAN

Tanaman Purwoceng (*Pimpinella pruatjan* Molck.) merupakan tumbuhan endemik Indonesia yang sudah lama dikenal sebagai obat. Bagian yang berkhasiat adalah akarnya, dikenal sebagai afrodisiak (Hernani dan Yuliani, 1991). Purwoceng termasuk dalam genus *Pimpinella*, suku *Apiaceae*/*Umbelliferae*, bangsa *Apiales*/*Umbelliflorae*. Purwoceng merupakan terna tahunan, tinggi tanaman purwoceng berkisar antara 15-50 cm, daun majemuk ganda, pangkal tangkainya melebar menjadi upih, duduk tersebar. Purwoceng tumbuh di pegunungan dengan ketinggian 1800-3500 m dpl, di Jawa Barat (Gunung Pangrango), Jawa Tengah (Dataran Tinggi Dieng) dan Jawa Timur (Burkill, 1935; Heyne, 1987). Sampai saat ini yang dikenal sebagai daerah pengembangannya hanya di Dataran Tinggi Dieng, Jawa Tengah dalam areal yang sempit.

Purwoceng mengandung berbagai senyawa metabolit sekunder yaitu: turunan kumarin, sterol, saponin dan

alkaloid (Caropeboka dan Lubis, 1975), isobergapten dan sphondin (Sidik 1975) serta diduga mengandung stigmasterol (Suzery et al, 2004) dan senyawa turunan kumarin seperti bergapten, santotoksin, marmesin dan 6,8 dimetoksi umbeliferon (Hernani dan Rostiana, 2004).

Pada umumnya tumbuhan yang mempunyai khasiat sebagai afrodisiak mengandung senyawa-senyawa tertentu, misalnya senyawa turunan saponin, alkaloid, senyawa yang berkaitan dengan steroid misalnya stigmasterol atau sitosterol dan senyawa-senyawa lain yang merupakan metabolit sekunder berkhasiat sebagai penguat tubuh serta memperlancar peredaran darah (Hernani dan Yuliani, 1991).

Produksi senyawa metabolit sekunder pada tanaman mempunyai variabilitas yang tinggi karena sangat tergantung dengan kondisi iklim, hama dan penyakit serta kondisi fisiologis dari tanaman tersebut. Senyawa dari tanaman sangat kompleks sehingga terkadang untuk pembuatannya secara sintesis sangat sulit dan mahal. Oleh karena itu sejumlah produk alami yang mempunyai nilai ekonomi tinggi masih diekstrak dari tanaman. Akan tetapi untuk keperluan dalam skala besar masih sulit terpenuhi karena senyawa alami diproduksi tanaman dalam jumlah sedikit dan pada jaringan yang spesifik misalnya pada akar. Untuk dapat memenuhi kebutuhan yang tinggi diperlukan penanaman dalam skala luas agar diperoleh akar yang banyak.

Pada beberapa tanaman teknik kultur in-vitro telah digunakan untuk memproduksi metabolit sekunder dalam skala industri. Keuntungan menggunakan teknik kultur in-vitro antara lain senyawa sekunder yang dihasilkan dapat diproduksi pada lingkungan yang terkendali, bebas dari deraan lingkungan, bebas dari hama, dapat menghasilkan senyawa spesifik, produksi dapat dilakukan sesuai kebutuhan, kualitas dan produksinya dapat lebih konsisten serta lahan yang dibutuhkan tidak luas, dan mengurangi upah buruh (Dalimoenthe, 1987; Ernawati, 1992).

METABOLIT SEKUNDER.

Metabolit sekunder merupakan senyawa yang disintesis tanaman yang digolongkan menjadi lima, yaitu glikosida, terpenoid, fenol, flavanoid, dan alkaloid. Senyawa-senyawa tersebut bermanfaat bagi tanaman itu sendiri maupun bagi serangga, hewan dan manusia. Fungsi senyawa metabolit sekunder sangat penting antara lain:

1. Sistem pertahanan terhadap virus, bakteri, dan jamur
2. Sistem pertahanan terhadap serangga
3. Sistem pertahanan terhadap tanaman lain melalui allelopati
4. Attraktan serangga untuk membantu polinasi
5. Sistem pertahanan terhadap lingkungan yang kurang menguntungkan, misalnya kekeringan, adanya logam berat dan keadaan yang terlalu panas.
6. Sebagai obat, food additive, flavor, pewarna dan pestisida nabati. (Vickery and Vickery, 1981).

KULTUR IN-VITRO UNTUK PRODUKSI METABOLIT SEKUNDER

Tanaman tingkat tinggi menghasilkan variasi metabolit sekunder yang besar dimana metabolit sekunder tersebut kecil peranannya dalam proses dasar kehidupan tanaman. Sebagian besar produk metabolit sekunder digunakan sebagai sumber produk dalam industri, misalnya sebagai bahan farmasi, bahan tambahan makanan (food additive), flavor, pewarna, dan pestisida nabati.

Kultur in-vitro untuk metabolit sekunder sering tidak berhasil. Hal ini berkaitan dengan ada tidaknya akumulasi metabolit sekunder yang ditentukan oleh pertumbuhan dan diferensiasi sel dari tanaman tersebut. Kendala lain, seperti cahaya, zat pengatur tumbuh, ketersediaan prekursor dan kendala biologis dari sel atau jaringan juga berperan terhadap sintesis metabolit sekunder. Pembentukan metabolit sekunder melalui kultur in-vitro dapat dikategorikan menjadi 4 yaitu

1. Senyawa yang pembentukannya tidak terkait pada diferensiasi sel tertentu, senyawa ini kadang kala terdapat pada kalus.
2. Senyawa yang biasanya terkait dengan diferensiasi sel tertentu
3. Senyawa yang distribusinya hanya sedikit terkandung di dalam tanaman, tetapi bagian yang membentuk dan mengakumulasinya tidak terlihat pada sel tertentu.
4. Senyawa ini disintesis dan diakumulasi oleh sel yang terkait dengan sel tertentu (Dalimoenthe, 1987).

Dengan kultur in-vitro pada media yang optimum, umumnya produksi metabolit sekunder terjadi pada fase akhir stasioner. Pertumbuhan yang terhambat sering di asosiasikan dengan sitodiferensiasi dan induksi enzim untuk metabolisme sekunder. Modifikasi media pertumbuhan untuk produksi metabolit sekunder antara lain: mengurangi zat pengatur tumbuh, mengurangi konsentrasi fosfat, meningkatkan gula atau alternatif lain sebagai sumber C/N (Bhojwani dan Razdan, 1996). Peningkatan metabolit sekunder juga dapat dilakukan dengan memanipulasi media kultur yaitu memberi prekursor dan ekstrak jaringan (Robins, 1994).

HAL YANG BERPENGARUH TERHADAP PENINGKATAN METABOLIT SEKUNDER MELALUI KULTUR IN-VITRO

Komposisi media kultur *In-vitro*

Komposisi media merupakan hal yang sangat penting dalam kultur in-vitro agar eksplan dapat tumbuh optimal. Komposisi media dasar kultur invitro terdiri atas unsur hara makro (N, P, K, Ca, Mg dan S), unsur hara mikro (Fe, Mn, Zn, Cu dan Mo), vitamin (thiamin, asam nikotinat dan peredoksin), myo-inositol, asam amino atau suplemen nitrogen lain (casein hidrolisat, L-glutamin, L-asparagin, adenin dan lain lain.) serta gula. Vitamin merupakan ko-enzim yang dapat meningkatkan aktivitas enzim (Lehninger, 1982; Albert *et al.*, 1994). Thiamin (B₁) dalam bentuk ko-enzim adalah thiamin pirofosfat yang berperan sebagai ko-enzim dehidrogenase piruvat dan dehidrogenase α -ketoglutarat (Lehninger, 1982). Vitamin B₁ merupakan vitamin yang sangat diperlukan dalam kultur in-vitro. Vitamin yang lain adalah niasin, piridoksin (B₆) sedangkan biotin, asam pantotenat, dan riboflavin jarang digunakan. Gula dalam kultur in-vitro sebagai sumber energi yang ada pada

tanaman biasanya merupakan hasil dari fotosintesis. Keseimbangan nutrisi dalam media sangat mempengaruhi pertumbuhan kultur in-vitro. Pada umumnya unsur makro lebih banyak dibutuhkan dalam proses fisiologi dan pembentukan sel dibanding unsur mikro.

Zat pengatur tumbuh

2,4-Diklorofenoksi-asetat (2,4-D) dan pikloram merupakan senyawa sintesis yang dapat berfungsi sebagai zat pengatur tumbuh dan herbisida. Pemberian dengan konsentrasi kecil memberikan respon pertumbuhan yang sama dengan indol asam asetat (IAA) sedangkan pada konsentrasi tinggi berfungsi sebagai herbisida. Diklorofenoksi-asetat sebagai auksin menyebabkan perluasan dan memicu pembelahan sel, tetapi tidak terjadi pemanjangan sel. Pembelahan sel yang berlebihan dan tidak diikuti dengan perluasan dan pemanjangan mengakibatkan terjadinya kalus. Pemberian 2,4-D pada medium dasar kultur in-vitro dapat menginduksi kalus dan menyebabkan pertumbuhan kalus terus berlangsung (Krikorian, 1995).

Ada tiga hal yang menarik dari senyawa 2,4-D jika dilihat dari aktivitasnya, yaitu

- a) Dibanding IAA, senyawa 2,4-D menunjukkan aktivitas auksin yang lebih tinggi
- b) Kelarutan dalam lemak dan air dari 2,4-D dan IAA adalah sama
- c) 2,4-Diklorofenoksi-asetat resisten terhadap IAA oksidase (Wattimena, 1988)

Naftalen asam asetat (NAA) merupakan auksin sintesis dan lebih stabil karena tidak mudah terdegradasi oleh enzim oksidase serta mudah ditranslokasikan (Gianfagna, 1995).

Prekursor

Kandungan metabolit sekunder pada kultur in-vitro dapat ditingkatkan dengan cara memberikan berbagai prekursor dalam lintasan biosintetik pada media. Pemberian prekursor tergantung pada senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh tanaman. Pada tanaman purwoceng senyawa yang dihasilkan adalah stigmasterol, senyawa tersebut terbentuk melalui lintasan mevalonat. Prekursor untuk membentuk stigmasterol adalah asam mevalonat dan skualena (Vikery dan Vikery, 1981; Dewick, 1997). Penambahan prekursor dapat memberikan berbagai pengaruh dalam sistem yang berbeda. Oleh karena itu, penambahan prekursor sangat berhubungan dengan konsentrasi, waktu, serta lintasan biosintetiknya agar

kandungan metabolit sekunder dapat meningkat. Skualena merupakan prekursor senyawa intermediet epoksi skualena yang merupakan percabangan untuk membentuk sterol dan triterpen saponin. Dalam lintasan biosintetik, skualena merupakan senyawa intermediet yang terbentuk lebih dekat dengan sitosterol. Oleh karena itu, pemberian skualena diharapkan dapat meningkatkan kandungan sitosterol, stigmasterol, atau triterpen saponin.

Stres abiotik menggunakan Polietilen glikol (PEG)

Stres abiotik pada kultur in-vitro, seperti cekaman kekeringan dapat meningkatkan kandungan metabolit sekunder. Salah satu cara tersebut dengan menggunakan Polietilen glikol yang merupakan senyawa kimia organik sebagai osmotikum dan menyebabkan stres air pada tanaman. Senyawa kimia tersebut mempunyai sifat tidak aktif, tidak bermuatan ion, kelarutan dalam air tinggi walaupun mempunyai cincin rantai panjang, dan mempunyai kisaran berat molekul yang luas. Berat molekul yang tinggi lebih dari 4.000 dapat menginduksi stres air pada tanaman dengan menurunkan potensial larutan nutrien. Polietilen glikol tidak terserap dan tidak mengakibatkan keracunan pada tanaman (Dami dan Hughes, 1997).

Pemberian PEG akan mempengaruhi penyerapan air sehingga kalus atau akar rambut mengalami stres. Kekurangan air akan menginduksi protein, mengkode gen-gen pembentuk enzim yang terlibat dalam biosintesis metabolisme sekunder. Dengan meningkatnya kandungan enzim dalam jaringan tanaman maka diharapkan kandungan metabolit sekunder dapat meningkat pula. Aktivitas enzim dipengaruhi, antara lain oleh adanya prekursor senyawa yang bersangkutan dan akumulasi produk metabolisme sekunder tersebut (Ernawati, 1992). Gejala spesifik yang dipengaruhi PEG sebagai stres osmotik adalah kemampuan pembesaran sel berkurang sehingga ukuran sel menjadi kecil, komposisi dinding sel berubah yaitu perbandingan selulosa dan hemiselulosa rendah dan mempengaruhi akumulasi bahan metabolit primer dan sekunder dalam sel tanaman (Bozhkov dan Arnold, 1998).

Bagian tanaman sebagai penyimpan metabolit sekunder

Metabolit sekunder pada tanaman disimpan pada bagian yang berbeda-beda, misalnya pada daun, akar, rimpang, trikhoma, dan bunga.

Khusus pada tanaman purwoceng, penyimpanan metabolit sekunder yang terbanyak pada bagian akar. Oleh sebab itu, produksi metabolit sekunder purwoceng sebaiknya menggunakan kultur akar. Kultur akar dapat diperoleh dari induksi eksplan menggunakan auksin atau induksi eksplan menggunakan *A. rhizogenes*. Akar yang berasal dari induksi *A. rhizogenes* disebut akar rambut, pertumbuhan akar rambut sangat cepat dibandingkan dengan akar biasa dari induksi auksin (Gambar 3).

Agrobacterium rhizogenes untuk induksi akar rambut purwoceng

Agrobacterium merupakan genus dari bakteri tanah gram negatif dari kelompok Rhizobiaceae. Dua spesies yang terkenal sebagai patogen tanaman adalah *A. tumefaciens* dan *A. rhizogenes*. *A. tumefaciens* menginduksi pertumbuhan sel-sel tumor, sedangkan *A. rhizogenes* menginduksi pertumbuhan akar adventif dengan rambut-rambut akar yang disebut akar rambut sehingga dapat digunakan sebagai tempat akumulasi metabolit sekunder. Akar rambut merupakan bentuk jaringan akar yang hidup dan secara terorganisir berdiferensiasi membentuk biomas akar tanpa ada organ lain, seperti batang, daun maupun bunga.

Keuntungan kultur akar rambut yaitu (1) dapat tumbuh pada media tanpa zat pengatur tumbuh, (2) lebih stabil dibanding dengan kultur suspensi, (3) pertumbuhannya lebih cepat dibanding akar yang berasal dari induksi zat pengatur tumbuh, (4) dapat menghasilkan akar rambut dalam jumlah besar dengan kualitas yang lebih baik dibanding akar biasa, dan (5) akar rambut dapat menghasilkan metabolit sekunder yang tinggi. Kultur akar rambut pada umumnya mempunyai sifat morfologi yang sama, seperti akar yang terdapat pada tanaman. Selain itu kultur akar rambut dapat diperbanyak dengan menanam potongan akar dan juga dapat diregenerasikan menjadi tanaman.

Hasil penelitian yang dilakukan di Balitro menunjukkan, eksplan petiol yang diinokulasi dengan semua strain Agrobacterium akar rambut tidak berhasil tumbuh, sedangkan eksplan daun dapat tumbuh akar rambut setelah diinokulasi dengan *A. rhizogenes* ATCC 15834 meskipun tingkat keberhasilannya hanya 20% dan setelah itu berkembang dengan baik. Keberhasilan eksplan daun dalam inokulasi kemungkinan disebabkan kompatibilitas Agrobacterium untuk

menerima isyarat dari tanaman peka yang luka dan diikuti dengan terinduksinya gen vir yang diperlukan dalam proses inokulasi.



Gambar 1. Akar rambut yang tumbuh dari daun setelah satu bulan diinokulasi dengan *A. rhizogenes* strain ATCC 15834 (kiri) dan LBA 9457 (kanan)

Pada awal inokulasi, daun yang diinokulasi Agrobacterium akan membengkak pada tulang daun dan terbentuk kalus. Selanjutnya, pada bagian kalus tersebut muncul akar rambut (Gambar 1). Hal ini, disebabkan adanya keseimbangan antara IAA dan sitokinin yang tinggi. Perbanyakkan akar rambut dilakukan dengan cara memotong akar rambut beserta kalusnya

(Gambar 3). Pola pertumbuhan cabang akar rambut yang diinokulasi *A. rhizogenes* maupun akar biasa terlihat sama yaitu mula-mula tumbuh kalus pada bagian ujung akar. Selanjutnya pada kalus tersebut tumbuh akar rambut yang baru. Akan tetapi, akar rambut baru pada akar yang diinokulasi *A. rhizogenes* lebih banyak dibanding dengan akar biasa (Gambar 3).



Gambar 2. Akar rambut pada umur 2 bulan (kiri), 4 bulan (tengah) dan 8 bulan (kanan) setelah sub kultur



Gambar 3. Pertumbuhan akar rambut (kiri) dan akar hasil induksi IBA (kanan)

(Gambar 2). Akar rambut yang diperbanyak tanpa menyertakan kalus tidak dapat tumbuh dengan cepat.

Eksplan yang tidak diinokulasi tidak dapat tumbuh akar tanpa pemberian auksin eksogen. Akar yang tumbuh dengan pemberian auksin tanpa inokulasi *A. rhizogenes* secara morfologi

PENUTUP

Untuk menghasilkan metabolit sekunder dari akar purwoceng yang berfungsi sebagai afrodisiak, modifikasi media pertumbuhan dapat dilakukan dengan: mengurangi zat pengatur tumbuh, mengurangi konsentrasi fosfat,

meningkatkan gula atau alternatif lain sebagai sumber C/N, selain itu dengan memanipulasi media kultur, yaitu memberi prekursor dan ekstrak jaringan sebagai elisitor. Secara in-vitro, jaringan tanaman akar rambut pada purwoceng dengan induksi *A. rhizogenes* dapat dimanfaatkan sebagai penghasil metabolit sekunder, disertai dengan ketepatan umur saat pengambilan dan media yang tepat untuk pertumbuhannya.

DAFTAR PUSTAKA

- Albert B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. 1994. *Molecular Biology of The Cell*. Ed ke3. New York: Garland.
- Bhojwani S, Razdan SMK. 1996. *Plant tissue culture : theory and practice, a revised edition*. Amsterdam.
- Bozhkov P, Arnold SV. 1998. PEG promotes maturation but inhibits further development of *Picea abies* somatic embryos. *Physiologia Plantarum* 104 : 211-224.
- Burkill IH. 1935. *A Dictionary of the Economic Products of the Malay Peninsula*. Vol ke-2. London.
- Caropeboka AM, Lubis I. 1975. Pemeriksaan pendahuluan kandungan kimia akar *Pimpinella alpina* (Purwoceng). Prosiding Simposium Penelitian Tanaman Obat I; Bogor, 8-9 Desember 1975. Bogor: Bag. Farmakologi-Dept. Fisiologi dan Farmakologi, Fak. Kedokteran Hewan-IPB. hlm 53-158.
- Dalimoenthe SL. 1987. Kultur jaringan sebagai sarana untuk menghasilkan metabolit sekunder. Seminar nasional metabolit sekunder, Yogyakarta. hlm 157-161.
- Dami I, Hughes HG. 1997. Effects of PEG-induced water stress on in-vitro hardening of 'Valiant' Grape. *Plant Cell Tissue and Organ Cult.* 47:97-101.
- Dewick PM. 1997. *Medicinal natural products a biosynthetic approach*. New York: J Wiley.
- Ernawati A. 1992. Produksi senyawa-senyawa metabolit sekunder dengan kultur jaringan tanaman I. Di dalam Wattimena GA, Gunawan LW, Mattjik NA, Syamsudin E, Wiendi NMA, Ernawati A, editor. Bogor: Bioteknologi tanaman. IPB. hlm 169-220.
- Gianfagna T. 1995. Natural and synthetic growth regulator and their use in horticultural and agronomic crops. Di dalam Davies, PJ., editor. *Plant hormones : physiology, biochemistry and molecular biology*. London : Kluwer Acad. hlm 751-773.
- Hernani, Yuliani S. 1991. Obat-obat afrodisiaka yang bersumber dari bahan alam. di Dalam Zuhud, E.A.M., editor. *Pelestarian Pemanfaatan Tumbuhan Obat dari Hutan Tropis Indonesia*. Bogor: Jurusan Konservasi Sumber Daya Hutan., Fakultas Kehutanan IPB dan IWF. hlm 130-134.
- _____, Rostiana O. 2004. Analisis kimia akar purwoceng (*Pimpinella pruatjan*). Makalah pada seminar IBEC. Yogyakarta, 14-15 Juli 2004. 10 hlm.
- Heyne K. 1987. *Tumbuhan berguna Indonesia*. Vol ke-3. Jakarta: Badan Penelitian dan Pengembangan Kehutanan.
- Krikorian AD. 1995. Hormones in tissue culture and micropropagation. di Dalam Davies PJ, editor. *Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology*. London : Kluwer Acad. hlm 774-792.
- Lehninger AL, 1982. *Dasar-Dasar Biokimia*. Maggy T, penerjemah. Jakarta: Penerbit Airlangga. Terjemahan dari: *Principles of Biochemistry*.
- Robins RJ. 1994. Secondary products from culture cell and organ: I Molecular and cellular approach. Di dalam Dixon RA, Gonzales RA, editor. *Plant cell culture apractical approach*. Ed ke-2. Tokyo: Oxford univ. pr. hlm 68-224.
- Sidik, Sasongko E, Kurnia, Ursula. 1975. Usaha isolasi turunan Kumarin dari akar Purwoceng (*Pimpinella alpina* Molk.) asal dataran tinggi Dieng. Prosiding Simposium Penelitian Tanaman Obat I; Bogor, 8-9 Desember 1975. Bogor: Bag. Farmakologi-Dept. Fisiologi dan Farmakologi, Fak. Kedokteran Hewan-IPB. Hlm 135-138d.
- Suzery MB, Cahyono, Ngadiwiyana H, Nurhasnawati. 2004. Senyawa stigmaterol dari *Pimpinella alpina* Molk. (Purwoceng). *Suplemen* 39 (1): 39-41.
- Vickery ML, Vickery B. 1981. *Secondary plant metabolism*. The London : Macmillan Pr.
- Wattimena G.A. 1988. *Zat pengatur tumbuh tanaman*. Bogor: PAU dan Lembaga Sumber Daya Informasi IPB.