

PENGARUH JENIS EKSPLAN DAN AUKSIN TERHADAP PERTUMBUHAN KALUS ARTEMISIA

**Ragapadmi Purnamaningsih, Endang Gati Lestari dan
Rossa Yunita**

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya
Genetik Pertanian

ABSTRAK

Artemisia merupakan salah satu tanaman penghasil senyawa bahan aktif (artemisinin) untuk pembuatan obat anti malaria. Peningkatan produksi artemisinin secara *in vitro* dapat dilakukan melalui kultur kalus. Untuk itu harus diketahui formulasi media yang optimum agar diperoleh pertumbuhan kalus yang cepat dengan struktur yang baik. Pembentukan kalus sangat dipengaruhi oleh jenis eksplan dan zat pengatur tumbuh. Tujuan penelitian ini adalah mendapatkan jenis eksplan dan formulasi media terbaik untuk pertumbuhan kalus yang optimal. Rancangan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap dengan 15 ulangan. Eksplan yang digunakan adalah daun dan batang. Untuk menginduksi pembentukan kalus dicoba formulasi media yaitu MS dengan penambahan zat pengatur tumbuh 2,4-D atau dicamba (1 dan 3 mg/l) dikombinasikan dengan BA (0, 0.1, 0.5 mg/l). Hasil penelitian menunjukkan bahwa tidak semua formulasi media yang digunakan dapat menginduksi terbentuknya kalus. Pada umumnya perlakuan kombinasi BA dengan 2,4-D atau dicamba tidak dapat menginduksi terbentuknya kalus, sebaliknya penggunaan 2,4-D atau dicamba secara tunggal dapat menginduksi pembentukan kalus. Penambahan 2,4-D (1 atau 3 mg/l) atau dicamba (1 atau 3 mg/l) dapat menginduksi pembentukan kalus sebesar 100%, sedangkan pertumbuhan kalus terbaik diperoleh dari perlakuan MS + dicamba (1 atau 3 mg/l) dengan rata-rata berat basah kalus masing-masing adalah 0.525 gram dan 0.609 gram. Berdasarkan struktur kalus yang terbentuk maka disimpulkan bahwa formulasi media terbaik untuk induksi kalus adalah MS + dicamba 1 mg/l, sedangkan penggunaan dicamba 3 mg/l menghasilkan kalus yang lebih banyak mengandung air (*vitrous*). Jika dibandingkan antara batang dan daun, maka penggunaan eksplan daun dapat menginduksi pembentukan kalus lebih cepat dibandingkan dengan batang.

PENDAHULUAN

Penyakit malaria merupakan penyakit yang sangat ganas di Indonesia dan negara lainnya, khususnya di Asia dan Afrika. Penyakit ini disebabkan oleh *Plasmodium spp.* yang ditularkan oleh nyamuk *Anopheles spp.* Peningkatan kasus serangan penyakit malaria meningkat dari waktu ke waktu karena sampai saat ini belum ditemukan vaksinnnya. Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa beberapa parasit malaria seperti *Plasmodium falciparum* (penyebab malaria tropika) telah resisten dengan obat malaria yang digunakan, diantaranya terhadap *quinine* yang berasal dari tanaman kina yang telah digunakan lebih dari 20 tahun, sehingga perlu dikembangkan obat anti malaria lainnya.

Artemisia annua L merupakan tanaman sub tropis yang berasal dari daerah Cina dan tersebar ke Vietnam dan Malaysia. Kandungan utama dari tanaman ini yaitu artemisinin, merupakan salah satu alternatif obat malaria yang telah digunakan di berbagai negara di dunia, terutama Afrika dan Asia. Saat ini obat malaria *artemisinin combination based therapy* (ACT) yang direkomendasikan WHO masih diperoleh dari impor. Padahal setiap tahun kebutuhan akan obat

malaria sangat tinggi di Indonesia, sehingga diperlukan dana yang sangat besar dalam rangka memenuhi kebutuhan obat-obatan tersebut. Untuk itu perlu mengupayakan pengadaan obat malaria tersebut di dalam negeri.

A. annua L. mempunyai nilai ekonomi yang tinggi, tanaman ini merupakan sumber artemisinin dan minyak atsiri esensial (Simon *et al.*, 1990). Menurut Klayman (1985) artemisinin merupakan produk metabolit sekunder yang memiliki kemampuan sebagai obat anti malaria tanpa memberikan efek samping yang berat seperti kina atau klorokuin. Penggunaan artemisinin ini telah dipromosikan oleh organisasi internasional seperti *Medicines Sains Frontiers (MSF)* (Tresnaningsih, 2006).

Artemisinin diperoleh dengan cara mengekstrak dari daun atau batang tanaman yang masih muda dari tanaman *Artemisia sp.* Senyawa tersebut merupakan kelompok sesquiterpen lakton dengan jembatan endoperoksida yang jarang ditemui di alam. Artemisinin merupakan senyawa yang sulit untuk disintesis, maka cara yang paling mudah dan murah untuk memperoleh artemisinin ialah dengan mengekstrak langsung dari tanamannya (Simon *et al.*, 1990).

Salah satu masalah dalam pengembangan tanaman artemisia di Indonesia adalah varietas yang ditanam mempunyai kandungan artemisinin yang sangat rendah, yaitu berkisar 0,01 – 0,5%. Cina telah berhasil mengembangkan beberapa klon yang produksi artemisininnya >1%, akan tetapi klon baru ini tidak di sebarluaskan karena bersifat spesifik lokasi. Dengan kandungan yang relatif kecil ini, tidak efisien untuk dikembangkan dalam skala industri.

Salah satu teknologi alternatif yang dapat diterapkan untuk memproduksi artemisinin yaitu teknologi kultur *in vitro*. Kelebihan produksi metabolit sekunder melalui kultur *in vitro* antara lain adalah faktor lingkungan tumbuh kultur dapat diatur dan dikendalikan sehingga tidak dipengaruhi oleh iklim, hama, penyakit, musim dan faktor lainnya, tidak membutuhkan areal penanaman yang luas, sistem produksinya dapat diatur, kualitas produksi lebih konsisten serta hasil metabolit sekunder yang diperoleh dapat lebih tinggi dari tanaman induknya (Ernawati, 1992).

Produksi metabolit sekunder melalui kultur *in vitro* dapat dihasilkan melalui kultur kalus (George dan Sherington, 1984). Pada kultur kalus, pemberian zat pengatur tumbuh (ZPT) baik auksin maupun sitokinin sangat diperlukan. Penggunaan ZPT tersebut dapat digunakan secara tunggal atau kombinasi dan dengan konsentrasi yang tepat diharapkan dapat menginduksi dan meningkatkan pertumbuhan kalus. Ravishankar dan Grewal (1991) melaporkan bahwa media dan prekursor mempengaruhi produksi diosgenin dari kultur kalus *Dioscorea deltoidea*. Selanjutnya Srividya dan Devi (1998) melaporkan bahwa produksi azadirachtin dan nimbin yang dihasilkan dari kultur tunas dan akar *Azadirachta indica* lebih tinggi dibandingkan dengan hasil tanaman dari lapang.

Produksi metabolit sekunder dengan menggunakan kultur sel dapat dijamin ketersediannya sepanjang tahun tanpa terhalang oleh musim. Kultur sel tanaman mengurangi pembatasan geografis untuk berproduksi (Lila, 2005).

Kandungan metabolit sekunder pada kultur *in vitro* dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain kondisi pertumbuhan kultur dan komposisi media pertumbuhan. Sintesis metabolit sekunder dipengaruhi oleh kondisi pertumbuhan dan waktu pembentukannya, dimana kondisi optimal untuk kedua fase mungkin berbeda. Pada fase pertumbuhan tertentu perlakuan media kultur baik fisik maupun kimia dapat meningkatkan kandungan metabolit sekunder (Thorpe, 1990).

BAHAN DAN METODA

Bahan tanaman yang akan digunakan adalah tanaman *A. annua* yang diperoleh dari Balitro. Kalus diinduksi dari daun dan batang tanaman yang berasal dari rumah kaca. Sterilisasi dilakukan dengan menggunakan alkohol, dan kloroks. Formulasi media yang akan digunakan adalah media dasar MS dengan penambahan ZPT yaitu 2,4-D, atau dicamba pada beberapa taraf konsentrasi (1 dan 3 mg/l), dikombinasikan dengan BA (0, 0,1; dan 0,5 mg/l). Subkultur dilakukan setiap bulan hingga terbentuk kalus. Rancangan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap dengan 15 ulangan. Peubah yang diamati adalah persentase pembentukan kalus, diameter kalus, bobot basah, struktur dan warna kalus.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian sementara menunjukkan bahwa tidak semua formulasi media yang digunakan dapat menginduksi terbentuknya kalus. Pada umumnya perlakuan kombinasi sitokinin (BA) dengan 2,4-D atau dicamba tidak dapat menginduksi terbentuknya kalus, sebaliknya dengan penggunaan 2,4-D atau dicamba secara tunggal dimana kalus dapat dihasilkan (Tabel 1). Pembentukan kalus pada berbagai formulasi media disajikan pada Gambar 1.

Tabel 1. Induksi kalus *artemisia* dari eksplan daun pada berbagai formulasi media

Formulasi media (mg/l)	pembentukan kalus (%)	Diameter kalus (cm ²)	Struktur kalus	Warna kalus
2,4-D 1	100	1,0	Remah	Hijau kekuningan
2,4-D1 + BA0.1	0	0	Remah	hijau-kuning,
2,4-D1 + BA0.5	0	0	Remah	Hijau-kuning,
2,4-D3	100	1,0	Remah	Putih kehijauan
2,4-D3 + BA0.1	0	0	Remah	Putih kehijauan
2,4-D3 + BA0.5	0	0	Remah	Putih kehijauan
Dicamba 1	100	1,1	Remah	Putih kehijauan
Dicamba1+ BA 0.1	0	0	Remah	Hijau kekuningan
Dicamba1+ BA 0.5	100	0	Remah	Hijau
Dicamba 3	100	1,67	Remah	Putih-hijau
Dicamba3+ BA 0.1	12,5	1,68	Remah	Putih kehijauan
Dicamba3+ BA 0.5	0	0	Remah	Hijau-coklat

Formulasi media terbaik untuk induksi kalus tanaman artemisia dengan menggunakan eksplan daun atau batang adalah MS + dicamba 1 atau 3 mg/l. Akan tetapi jika dilihat dari struktur kalusnya, maka kalus yang diperoleh dengan menggunakan media dicamba 1 mg/l menghasilkan kalus yang remah dan berbentuk globular, sedangkan penggunaan dicamba 3 mg/l menghasilkan kalus yang lebih banyak mengandung air (vitrous). Jika dibandingkan antara batang dan daun, maka eksplan penggunaan eksplan daun dapat menghasilkan kalus lebih cepat dibandingkan dengan batang. Hal tersebut terlihat dari diameter kalus dan bobot basahanya (Tabel 2 dan 3). Dengan menggunakan kedua formulasi media tersebut kalus terbentuk dengan cepat yang terlihat dari diameter kalus dan bobot basahanya (Tabel 3). Pembentukan kalus dari eksplan batang dan daun disajikan pada Gambar 2.

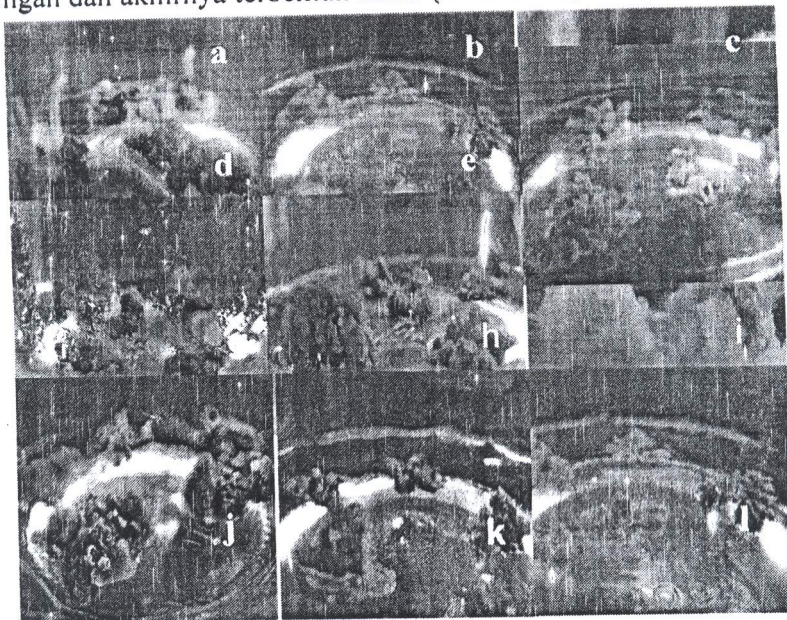
Pembentukan kalus sangat dipengaruhi oleh jenis eksplan dan zat pengatur tumbuh yang digunakan. Eksplan dengan jaringan yang meristematik akan terbentuk kalus lebih mudah dibanding jaringan yang sudah tua. Eksplan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun dan batang. Eksplan dari daun lebih banyak mengandung senyawa pektat dan protein sedangkan batang lebih banyak mengandung selulosa (Taiz dan Zeiger, 2002).

Tabel 2. Induksi kalus artemisia dari eksplan batang pada berbagai formulasi media

Formulasi media (mg/l)	pembentukan kalus (%)	Diameter kalus (cm ²)	Struktur kalus	Warna kalus
2,4-D 1	100	0,23	Remah	Hijau kekuningan
2,4-D1 + BA 0,1	40	0,30	Remah	hijau-kuning
2,4-D1 + BA 0,5	50	0,25	Remah	Hijau-kuning
2,4-D3	100	0,30	Remah	Putih kehijauan
2,4-D3 + BA 0,1	12.5	0,20	Remah	Putih kehijauan
2,4-D3 + BA 0,5	33.3	0,23	Remah	Putih kehijauan
Dicamba 1	100	0,38	Remah	Putih kehijauan
Dicamba 1 + BA 0,1	0	0	Remah	Hijau kekuningan
Dicamba 1 + BA 0,5	50	0,24	Remah	Hijau
Dicamba 3	100	1,05	Remah	Putih-hijau
Dicamba 3 + BA 0,1	40	0,35	Remah	Hijau
Dicamba 3 + BA 0,5	20	0,20	Remah	Hijau-coklat

Penggunaan zat pengatur tumbuh dicamba menghasilkan struktur kalus yang lebih baik dibandingkan dengan 2,4-D. Pada awalnya penggunaan 2,4-D menghasilkan kalus dengan struktur yang baik, dimana kalus berwarna putih kehijauan dengan struktur remah. Akan tetapi setelah 4 minggu pada permukaan kalus tumbuh akar. Diduga hal ini disebabkan oleh kandungan auksin endogen yang cukup tinggi di dalam jaringan. Oleh karena itu penambahan dicamba memberikan pengaruh yang baik terhadap pembentukan dan pertumbuhan kalus.

Dicamba merupakan salah satu jenis auksin yang mempunyai aktivitas tinggi. Dalam hal ini penambahan dicamba dapat menekan aktivitas auksin endogen dalam jaringan sehingga terjadi kesetimbangan kandungan auksin dan sitokinin dalam jaringan dan akhirnya terbentuk kalus (Wattimena, 1988).

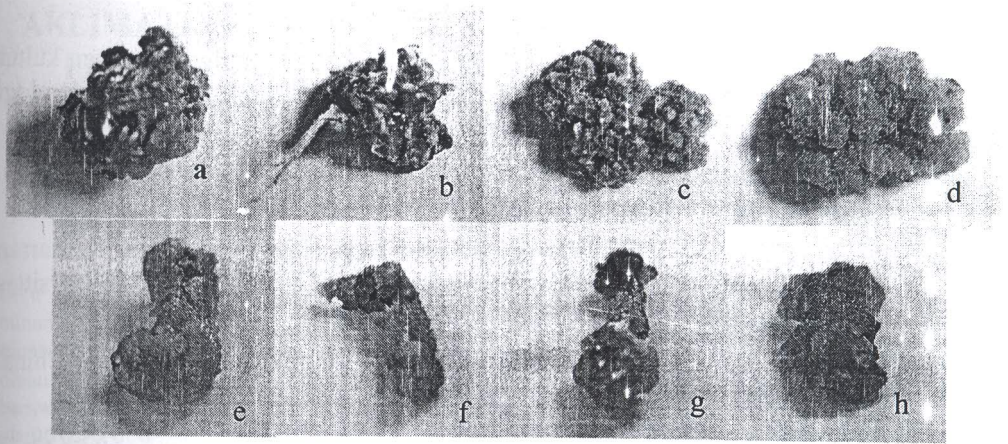


Gambar 1. Pembentukan kalus pada berbagai formulasi media

- | | | |
|-------------|------------------|------------------|
| a. 2,4-D1 | b. 2,4-D1BA0.1 | c. 2,4-D1BA0.5 |
| d. 2,4-D3 | e. 2,4-D3BA0.1 | f. 2,4-D3BA0.5 |
| g. Dicamba1 | h. Dicamba1BA0.1 | i. Dicamba1BA0.5 |
| j. Dicamba1 | k. Dicamba1BA0.1 | l. Dicamba1BA0.5 |

Tabel 3. Pengaruh jenis auksin dan konsentrasinya terhadap bobot basah kalus

Jenis eksplan	Bobot basah kalus (g)			
	2,4-D1 mg/l	2,4-D3 mg/l	Dicamba 1 mg/l	Dicamba 3 mg/l
Daun	0,32	0,37	0,53	0,61
Batang	0,23	0,19	0,23	0,57



Gambar 2. Pembentukan kalus dengan menggunakan jenis eksplan dan formulasi media berbeda

Atas. Kalus yang diinduksi dari eksplan daun

Bawah. Kalus yang diinduksi dari eksplan batang

a dan e. 2,4-D1 mg/l

b dan f. 2,4-D3 mg/l

c dan g. Dicamba 1 mg/l

d dan h. Dicamba 3 mg/l

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kalus yang terbentuk dari eksplan daun berwarna hijau atau putih kekuningan sedangkan kalus yang berasal dari batang berwarna kecoklatan. Hal ini disebabkan karena batang banyak mengandung selulosa dan fenol sehingga kalus berwarna coklat. Selulosa dan fenol yang tinggi menyebabkan pembelahan sel terhambat sehingga laju pertumbuhan berkurang.

Kalus asal eksplan daun mempunyai bobot basah 2 kali lebih besar dibanding kalus asal eksplan batang. Peningkatan bobot basah kalus dapat mencapai 2 kali lipat pada media 2,4-D 3 mg/l atau dicamba 1 mg/l. Hal tersebut sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Slusarkiewicz-Jarzina *et al.* (2005) dimana pembentukan kalus dari tanaman *Canabis sativa* yang berasal dari eksplan daun adalah 75,1% sedangkan yang berasal dari eksplan petiol 34,2%. Diduga hal ini disebabkan karena daun muda banyak mengandung IAA dan sukrosa yang diperlukan untuk pembelahan sel sehingga laju pembentukan kalus meningkat (Salisbury dan Ross, 1992).

KESIMPULAN

1. Eksplan terbaik yang dapat digunakan untuk menginduksi pembentukan kalus artemisia adalah daun
2. Penggunaan auksin yang dikombinasikan dengan sitokinin tidak dapat menginduksi pembentukan dan pertumbuhan kalus artemisia.
3. Formulasi media terbaik induksi kalus tanaman artemisia adalah MS + dicamba 1 mg/l.

DAFTAR PUSTAKA

- Ernawati, A. 1992. Produksi senyawa-senyawa metabolit sekunder dengan kultur jaringan tanaman. hal 169-208 Dalam Wattimena, G.A. 1992. Bioteknologi Tanaman I. PAU Bioteknologi IPB. Bogor. 309h.
- George, E.F. and P.D. Sherrington. 1994. Plant Propagation by Tissue Culture. Exegetics. Limited. England. 709 p.
- Gunawan dan Ernawati. 1992. Produk sekunder. H: 328-415. Dalam S. Haran dan N. Ansori (Eds.). Bioteknologi Tanaman 2. Pusat antar Universitas (PAU) Bioteknologi IPB (Tidak dipublikasikan).
- Klayman, D.L. 1985. Quinghaosu (artemisin): an antimalarial drug from China. Science 228:1049-1055.
- Lila, M. N. 2005. Valuable secondary product from *in vitro* culture. P. 285-299. In R.N. Trigiano and D.J. Gray (Eds.). Plant Development and Biotechnology CRC Press. LLC, 2000 New York.
- Ravishankar, GA, and Grewal S. 1991. Development of media for growth of *Dioscorea* cells and *in vitro* diosgenin production : Influence of media constituents and nutrient stress. Biotechnol Lett. 13:125-130.
- Simon, J. E., D. Charles , E. Cebert, L. Grant, J. Janick and A. Whipkey. 1990. *Artemisia annua* L. : Promising aromatic and medicinal, p. 522-526. In : Janick, J. and J. E. Simon (eds). Advances in new crops . Timber press, portland, OR.
- Salisbury, F.B. dan C.W. Ross, 1992. Fisiologi Tumbuhan. Lukman, D.R., Sumaryono (penerjemah); Niksolihin, S, (editor). ITB, Bandung. Terjemahan dari Plant Physiology.
- Slusarkiewicz-Jarzina, A. A. Ponitka, K.Y. Paek. 2005. Optimization of organic nutrients for ginseng hairy roots production in large-scale bioreactor. Curr. Sc. 89:641-649.
- Srividya, N and B.P.S. Devi. 1998. Azadirachtin and nimbin content in *in vitro* cultured shoots and roots of *Azadirachta indica*. A. Juss. IndianJ. Plant Physiol. 3:129 - 134.
- Taiz, L. and E. Zeiger, 2002. Plant Physiology. Third edition. USA: Sinauer
- Tresnaningsih, E. 2006. Balitbangkes Depkes Tengah Mengembangkan Obat Malaria Baru. Balitbangkes Depkes.
- Thorpe, T.A. 1990. The current status of plant tissue culture. Dalam Bhojwani, SS. Editor. Plant tissue culture : Applications and limitations. New York. Elsevier. hal. 1 - 33.
- Wattimena, G.A. 1988. Zat pengatur tumbuh tanaman. PAU dan Lembaga Sumber Daya Informasi. IPB. Bogor.
- Yoshikawa, T. 1997. Production of Ginsenosides in Ginseng Hairy Root Culture. The Netherlands : Harwood academic publishers. hal. 73-79.