

Produksi Senyawa Metabolit Sekunder Melalui Kultur Jaringan dan Transformasi Genetik *Artemisia Annu* L.

Meilina Marsinta Manalu, Komar Ruslan Wirasutisna, *Elfahmi

Kelompok Keilmuan Biologi Farmasi, Sekolah Farmasi, Institut Teknologi Bandung,
Jalan Ganesha 10 Bandung 40132

Abstrak

Produksi metabolit sekunder pada tanaman biasanya menghasilkan kadar yang rendah. Metode bioteknologi telah terbukti dapat meningkatkan produksi beberapa metabolit sekunder pada tanaman. Untuk meningkatkan perolehan metabolit sekunder telah digunakan teknik kultur jaringan dan transformasi genetik dengan induksi *Agrobacterium rhizogenes*. Penelitian ini bertujuan untuk meningkatkan kandungan metabolit sekunder dari kultur kalus dan akar rambut dari tanaman *Artemisia annua* hasil transformasi genetik menggunakan *A. rhizogenes*. Kultur kalus dan akar rambut hasil transformasi genetika mengandung senyawa artemisinin lebih tinggi dibanding dengan kultur kalus dan akar tanpa transformasi.

Kata Kunci : *Artemisia annua*, kultur kalus, akar rambut *Agrobacterium rhizogenes*, artemisinin.

Abstract

The production of secondary metabolites of plant is usually low. Biotechnological methods have been proved to enhance the production of some of plant's secondary metabolites. To enhance the production of secondary metabolites, cell cultures and genetically transformed plants which were induced by *Agrobacterium rhizogenes* have been used. This research aimed to enhance the secondary metabolite content from *A. rhizogenes* transformed callus and hairy roots cultures of *Artemisia annua*. Genetically transformed callus and hairy root cultures of *A. annua* contained higher artemisinin content compared to untransformed callus and root cultures.

Keywords : *Artemisia annua*, callus cultures, hairy roots, *Agrobacterium rhizogenes*, artemisinin.

Pendahuluan

Tumbuhan merupakan salah satu penghasil metabolit sekunder yang banyak digunakan sebagai obat. Beberapa masalah yang sering ditemukan dalam pengembangan tumbuhan obat antara lain rendahnya kadar senyawa metabolit sekunder tumbuhan. Kadar senyawa yang rendah dalam tanaman akan dapat menyebabkan kebutuhan tanaman dalam jumlah yang banyak, sehingga dapat berpengaruh pada kebutuhan terhadap lahan yang membutuhkan proses konservasi serta kultivasi. Salah satu solusi masalah ini dengan menggunakan metode kultur jaringan dan proses transformasi genetik yang dapat memperbanyak produk metabolit (Radji 2005). Kultur jaringan adalah suatu usaha dalam membudidayakan suatu jaringan tanaman menjadi tanaman kecil yang mempunyai sifat seperti induknya. (Hendaryono dan Wijayani 1994)

Salah satu teknik yang digunakan dalam kultur jaringan yang bertujuan untuk meningkatkan metabolit sekunder dari tanaman adalah dengan cara transformasi genetik dengan menggunakan *Agrobacterium rhizogenes*. Bakteri gram negatif ini menyebabkan infeksi pada luka dari tanaman dengan mentransfer segmen DNA (T-DNA) dari plasmid penginduksi akar (*Ri plasmid*) ke dalam sel tanaman yang diinfeksi sehingga terjadi keseimbangan

hormonal yang baru terbentuk akan menginduksi pembentukan akar yang disebut akar rambut (*hairy root*), yang akan mempengaruhi pembentukan metabolit sekunder dari tanaman (Maddalena 2004).

Penelitian ini bertujuan untuk menghasilkan kultur kalus dan akar rambut yang berpotensi menghasilkan metabolit sekunder dengan kadar lebih tinggi dari kadar tumbuhan aslinya. Dalam penelitian ini dikembangkan metode transformasi akar rambut dengan menggunakan *A. rhizogenes* strain ATCC 15834 dan objek yang dipilih adalah tanaman *Artemisia annua* L. *A. annua* L. sudah lama digunakan untuk menyembuhkan penyakit malaria dan demam di dataran Cina. Aktivitas biologi yang menyebabkan antimalaria adalah kandungan artemisinin yang terdapat di dalamnya (Bhakuni 2001). Penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat untuk meningkatkan hasil produksi metabolit sekunder pada tanaman-tanaman obat yang lain sehingga dapat memenuhi kebutuhan masyarakat akan obat.

Percobaan

Bahan

Bagian tanaman masing-masing daun dan akar *Artemisia annua* L., etanol 70%, air suling, larutan natrium

*Penulis korespondensi. E-mail: elfahmi@fa.itb.ac.id

hipoklorit, bahan-bahan media YMA dan YMB, bahan-bahan media Murashige-Skoog (MS) dan Gamborg untuk pertumbuhan tanaman, sukrosa, asam asetat naftalen (NAA), benzilaminopurin (BAP), sefotaksim, metanol, n-heksana, pelat kromatografi lapis tipis, membran filter 0,2 dan beberapa bahan yang sering digunakan untuk sterilisasi.

Alat

Cawan Petri, botol-botol kultur, pisau bedah, pinset, autoklaf, timbangan, *laminar air flow*, pH meter, botol semprot, lampu spiritus, jarum Ose, *filter holder*, *agitator*, pelat KLT, spektrofotodensitometer, dan beberapa perangkat gelas yang sering digunakan di laboratorium biologi farmasi.

Jenis Mikroba dan Kondisi Kultur

Agrobacterium rhizogenes ATCC 15834. Bakteri *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834 ditumbuhkan dengan beberapa dua medium, yaitu medium YMA dan YMB, dan diinkubasi selama 4 hari pada suhu 25°C terlindung dari cahaya matahari.

Koleksi Tanaman Obat

Koleksi tanaman obat *Artemisia annua* L. diperoleh dari PT. SIL Perkebunan Nusantara, Subang, Jawa Barat dan dideterminasi di Herbarium Bandungense, Sekolah Tinggi Ilmu dan Teknologi Hayati, Institut Teknologi Bandung. Bagian yang digunakan sebagai eksplan adalah daun tanaman *Artemisia annua* L.

Optimasi Sterilisasi, Medium Pertumbuhan dan Hormon Pertumbuhan Daun Tanaman

Setelah beberapa kali percobaan, diperoleh cara sterilisasi untuk daun tanaman sebagai berikut: daun dicuci dengan air keran, dikeringkan dengan kertas tisu kemudian direndam dengan alkohol 70% selama 1 menit; dibilas dengan air suling steril lalu direndam dalam larutan natrium hipoklorit 0,25%-1% dan tween 20 beberapa tetes selama 10-15 menit kemudian dibilas dengan air suling steril sebanyak tiga kali. Pemilihan medium dilakukan dengan memindahkan daun tanaman yang telah disterilkan ke dalam medium Murashige-Skoog (MS) (Murashige and Skoog 1962) dan Gamborg. Optimasi hormon pertumbuhan dilakukan dengan mencoba berbagai komposisi hormon auksin dan sitokinin.

Induksi Kalus

Dilakukan dengan menanam daun tanaman *A. annua* yang telah disterilkan ke dalam media MS yang ditambahkan dengan sukrosa 20g/L, NAA 2 mg/L, BAP 1 mg/L lalu diinkubasi pada selama 30-40 hari, pada suhu 17-23°C dengan pencahayaan lampu neon 20 Watt. Kultur kemudian diperbaharui selama 3-4 minggu dengan mengganti media yang digunakan.

Kalus yang terbentuk disubkultur (mengganti media yang dipergunakan) hingga terbentuk akar, sedangkan untuk kontrol negatif dilakukan subkultur dengan memindahkan kalus ke media tanpa hormon. Untuk *A. annua* dilakukan hal yang sama tetapi dengan penambahan komposisi hormon NAA 2 mg/L dan BAP 0,5 mg/L.

Induksi dengan *Agrobacterium rhizogenes*

Kalus tanaman *A. annua* yang terbentuk kemudian diinduksi dengan menggunakan bakteri *A. rhizogenes* yaitu dengan cara mencelupkan kalus yang terbentuk ke dalam suspensi bakteri selama 1 jam lalu dipindahkan ke dalam media MS yang ditambah sukrosa 20g/L, NAA 2 mg/L, dan BAP 0,5 mg/L diinkubasi selama 4 hari lalu dipindahkan ke media yang berisi sukrosa 20g/L dan sefotaksim 200mg/L.

Evaluasi dan Penentuan Kadar

Bahan *Artemisia annua* L. yang akan diekstraksi berupa bahan hasil kultur jaringan tanpa transformasi yaitu kalus yang ditumbuhi akar, kalus saja, kalus dan akar hasil transformasi, maupun tanaman asli. Ekstraksi artemisinin dilakukan dengan cara maserasi, menggunakan metanol yang kemudian diuapkan, lalu diekstraksi dengan pelarut n-heksana selama 3x24 jam. Hasil ekstraksi kemudian dipantau dengan menggunakan KLT yang dikembangkan dengan menggunakan pelarut toluena:aseton (19:1) dan ditambahkan penampak bercak vanilin sulfat, lalu diamati dengan menggunakan spektrofotodensitometer.

Hasil dan Pembahasan

Pemilihan Medium Pertumbuhan Bakteri (*Agrobacterium rhizogenes*)

Hasil percobaan menunjukkan bahwa bakteri *A. rhizogenes* dapat tumbuh dalam media YMA dengan kandungan manitol sebagai sumber karbon sehingga bakteri dapat tumbuh dan memperbanyak diri.

Optimasi Sterilisasi, Medium Pertumbuhan dan Hormon Pertumbuhan Daun Tanaman

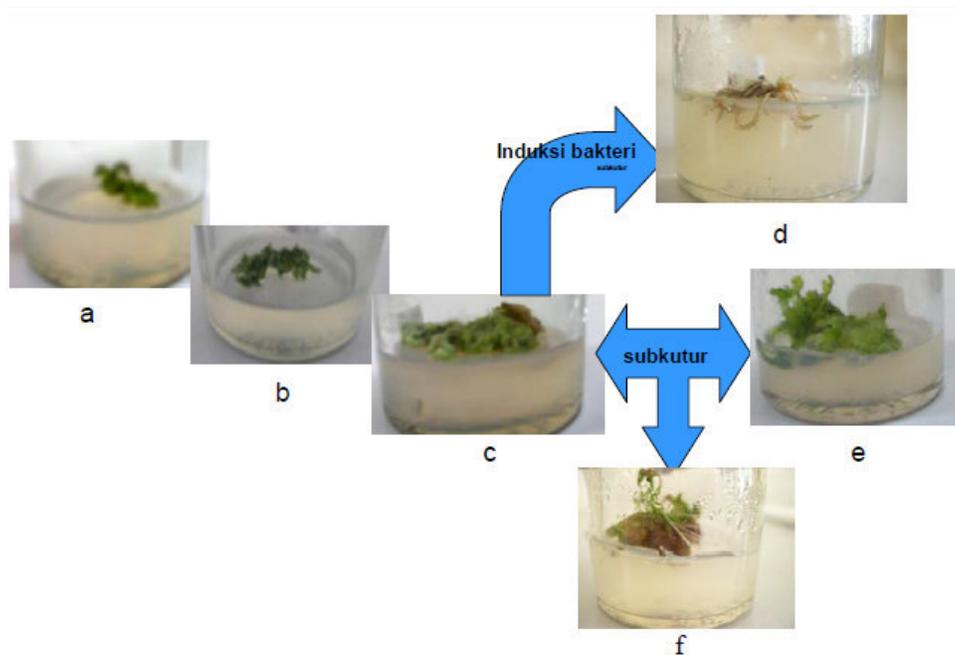
Dari optimasi sterilisasi tanaman diperoleh waktu dan konsentrasi optimum yang tepat sehingga tanaman tersebut steril. Dalam percobaan dapat terlihat bahwa telah dilakukan tahapan proses sterilisasi yang sama tetapi dengan konsentrasi natrium hipoklorit dan waktu perendaman yang berbeda-beda. Perlu dilakukan penyesuaian karena jenis tanaman yang berbeda menyebabkan jaringan tanaman juga berbeda-beda. Jika jaringan tanaman tersebut lunak, hanya perlu waktu yang singkat dan konsentrasi yang cukup rendah dibandingkan jika jaringan tanaman tersebut keras.

Optimasi medium pertumbuhan dilakukan dengan menggunakan medium Murashige-Skoog (MS) dan Gamborg yang masing-masing komposisinya berbeda. Dari hasil yang diperoleh, media MS cocok untuk pertumbuhan tanaman ini. Sedangkan pada media Gamborg, tanaman tersebut tidak dapat tumbuh bahkan cenderung mati. Hal ini disebabkan karena komponen hara pada medium MS cocok dan mendukung kebutuhan mineral tanaman tersebut.

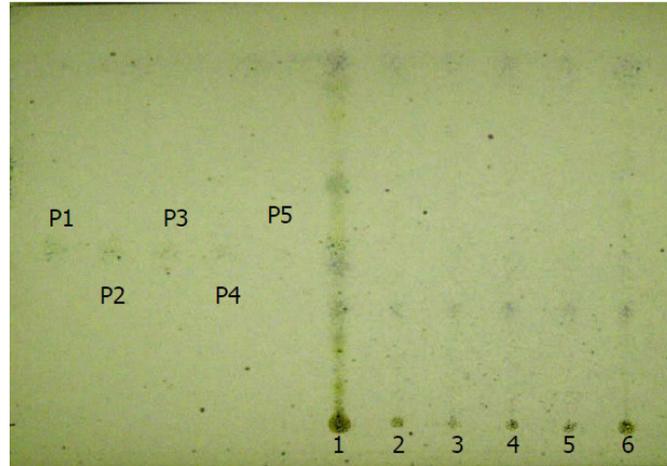
Hormon yang sering dipergunakan untuk pertumbuhan tanaman pada kultur jaringan adalah hormon auksin dan sitokinin. Optimasi penggunaan hormon pertumbuhan dilakukan dengan penambahan berbagai komposisi NAA dan BAP. NAA merupakan golongan auksin sintetis yang stabil. Benzil aminopurin (BAP) merupakan hormon sitokinin sintetis. Penambahan zat pengatur ini tergantung dari

tujuan penelitian, misalnya untuk menginduksi pertumbuhan kalus saja atau ingin menumbuhkan akarnya, tunasnya terlebih dahulu atau kedua-duanya. Oleh karena itu perlu optimasi kadar kedua hormon yang tepat untuk pertumbuhan organ-organ tanaman pada jenis tanaman yang berbeda-beda. Hasil induksi daun *A. annua* yang diinkubasi di dalam media dapat dilihat pada Gambar 1.

Gambar 1 menunjukkan bentuk akar hasil induksi bakteri yang berbeda dengan akar biasa hasil subkultur tanpa induksi bakteri. Bentuk akar hasil induksi bakteri memiliki bentuk yang kasar dan tidak memiliki percabangan. Sedangkan bentuk akar tanpa induksi bakteri memiliki percabangan dari akar utamanya. Pola kromatogram hasil ekstraksi artemisinin pada *A. annua* dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 1. Hasil induksi daun *Artemisia annua* yang diinkubasi di dalam media (a) umur daun setelah 7 hari (b) umur daun setelah 14 hari (c) umur daun setelah 50 hari dan terbentuk kalus (d) kalus yang diinduksi di dalam bakteri lalu diinkubasi pada media tanpa hormon menghasilkan akar rambut setelah 100 hari (e) kalus yang tidak mengalami perubahan setelah disubkultur selama 120 hari di dalam media tanpa hormon (f) kalus yang membentuk akar dan tunas setelah disubkultur selama 120 hari di dalam media dengan hormon.



Gambar 2. Pola kromatogram hasil ekstraksi artemisinin pada *Artemisia annua* : P1-P6 = Pembanding artemisinin dengan kadar yang berbeda-beda, 1 = Sampel hasil ekstraksi tanaman asli, 2 = Sampel hasil ekstraksi kalus nontransformasi, 3 = Sampel hasil ekstraksi kalus transformasi, 4 = Sampel hasil ekstraksi akar nontransformasi, 5 = Sampel hasil ekstraksi akar transformasi, 6 = Sampel hasil ekstraksi kalus saja.

Tabel 1. Hasil Pengukuran Artemisinin Hasil Ekstraksi *Artemisia annua* Menggunakan Spektrofotodensitometer

Sampel	Area	Kadar (µg)
Pembanding 1 (P1)	963,47	12,000
Pembanding 2 (P2)	1205,14	8,000
Pembanding 3 (P3)	394,25	6,000
Pembanding 4 (P4)	209,82	2,250
Pembanding 5 (P5)	176,43	0,750
Tanaman asli (1)	268,18	2.370
Kalus nontransformasi (2)	-	-
Kalus transformasi (3)	802,76	8.253
Akar nontransformasi (4)	-	-
Akar transformasi (5)	159,48	0.8
Kalus (6)	-	-

Keterangan : (-) menunjukkan tidak adanya data yang dapat dihasilkan oleh spektrofotodensitometer.

Pada pola kromatogram yang diperoleh dapat dilihat bahwa noda pada pembanding P5 tidak terlihat dengan jelas sedangkan pada pembanding lain jelas terlihat hal ini dikarenakan kadar senyawa artemisinin yang ditotolkan pada pelat KLT sangat sedikit. Pola kromatogram ini kemudian diamati dengan menggunakan spektrofotodensitometer pada panjang gelombang 570 nm.

Hasil pengukuran artemisinin yang berasal dari ekstraksi *A. annua* dapat dilihat pada Tabel 1. Pada tabel tersebut dapat dilihat bahwa pada sampel nomor 2 (kalus nontransformasi), sampel nomor 4 (akar nontransformasi), dan sampel nomor 6 (kalus

saja) tidak dapat dikuantifikasi menggunakan alat spektrofotodensitometer hal ini mungkin disebabkan kadar artemisinin yang diperoleh sangat sedikit. Jika dibandingkan dengan pola kromatogram yang telah diperoleh, pada sampel nomor 1 (tanaman asli) terlihat noda yang jelas dan terlihat secara visual. Namun, ketika dibandingkan dengan hasil yang diperoleh dengan menggunakan spektrofotodensitometer hanya diperoleh kadar yang kecil jika dibandingkan dengan sampel nomor 3 (kalus transformasi) yang nodanya tidak terlihat jelas pada pola kromatogram. Hal ini disebabkan karena pada tanaman *A. annua* juga terdapat jenis senyawa lain yang satu golongan dengan artemisinin

yaitu golongan seskuiterpen. Senyawa-senyawa ini juga akan bereaksi dengan vanilin sulfat dan memberikan bercak yang sama. Oleh karena itu perlu adanya pembanding artemisinin sehingga dapat dibedakan mana senyawa artemisinin dan mana yang bukan pada hasil ekstraksi. Dari percobaan diperoleh bentuk akar *A. annua* L. hasil transformasi genetik berbeda dengan bentuk akar tanpa transformasi genetik. Dan dari hasil penentuan kadar tersebut dapat diketahui bahwa kadar artemisinin pada kalus dan akar hasil transformasi lebih tinggi dibandingkan dengan tanaman asli maupun hasil kultur jaringan tanpa transformasi genetik. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa telah terjadi transformasi genetik terhadap kalus yang telah diinduksi dengan bakteri *A. rhizogenes*. Untuk memastikan kebenaran hasil transformasi genetik perlu diuji dengan bantuan alat PCR sehingga dapat dipastikan bahwa gen pada bakteri telah masuk ke dalam sel tanaman.

Kesimpulan

Kultur kalus dan akar rambu hasil transformasi dari *A. annua* telah berhasil ditumbuhkan. Akar rambu *A. annua* hasil transformasi genetik yang bentuk akar dan kadar artemisinin yang berbeda dengan akar biasa tanpa transformasi genetik. Produksi artemisinin dari hasil transformasi genetik lebih tinggi dari tanaman aslinya.

Daftar Pustaka

Bhakuni RS, Sharma J, Kumar S, 2001, *Secondary Metabolites of Artemisia annua and Their Biology Activity*, Curr. Sci. 80: 35-47.

Hendaryono D, Wijayani A, 1994, Teknik Kultur Jaringan, Penerbit Kanisius, Yogyakarta, 31-33, 59-76.

Maddalena M, 2004, *Agrobacterium rhizogenes* rolB dan rolD genes : Regulation and Involvement in Plant Development, J. Plant Cell Tissue and Organ culture 77: 89-101.