

OPTIMASI UMUR KALUS SEBAGAI DONOR SEL TERHADAP BIOMASSA DAN KADAR SAPONIN PADA KULTUR AGREGAT SEL *Talinum paniculatum* (Jacq) Gaertn

*Optimization of Callus Age as Cell Donor to Biomass and Saponin Content in Cell Aggregate Culture of *Talinum paniculatum* (Jacq) Gaertn*

Agus Muji Santoso

Universitas Nusantara PGRI Kediri
E-mail: agusmujisantoso@gmail.com

Abstract - This study was aimed to explore the age appropriate of callus which forming cell suspension in liquid culture. *T. paniculatum* leaf explants planted on solid MS medium with the addition of 2 ppm of 2,4 D and 1 ppm kinetin. Callus was on 3, 4, 5, and 6 weeks moved separately in 50 mL of liquid MS with 1 ppm 2,4 D and 1 ppm kinetin, agitated at 100 rpm for six days in absolute dark conditions ($25 \pm 1^\circ\text{C}$). Dry biomass and total saponins were measured by the Hu method. Callus on 4-week-old callus has the highest biomass (0.16×10^{-3} g), but the highest levels of saponins derived callus at the age of 5 weeks (17.45 ppm).

Keywords: biomassa, callus age, total saponin, *Talinum paniculatum*, cell agregat

PENDAHULUAN

Talinum paniculatum (Som Jawa) dikenal masyarakat tropis sebagai tumbuhan herba yang memiliki beberapa khasiat pada umbi akarnya (Santoso, 2012). Penelitian terdahulu telah berhasil mengungkap potensi umbi *T. paniculatum*, antara lain sebagai pemacu jumlah dan motilitas sperma (Saroni *et al.*, 1999), anti radang (Sumastuti, 1999), potensi androgenik (Winarni, 2009), dan potensi viabilitas sperma (Rahmi *et al.*, 2011). Oleh karena itu, upaya untuk meningkatkan produksi saponin perlu terus dilakukan.

Produksi dalam skala besar di lapang memiliki banyak keterbatasan. Selain masalah modal, minimnya informasi tanam di lapang, serangan hama patogen, juga perlu dipertimbangkan semakin sempitnya lahan pertanian yang tersedia. Sharma *et al.* (2011) menyatakan bahwa bioteknologi kultur *in vitro* memiliki prospek untuk mengatasi keterbatasan tersebut. Salah satunya dengan kultur agregat sel. Kultur agregat sel pada media cair memiliki kelebihan. Selain lebih mudah dilakukan, metabolit sekunder target dapat diproduksi dengan mudah dan dalam waktu yang relatif cepat jika dibanding dengan kultur kalus.

Keunggulan lainnya adalah kultur tersebut dapat digunakan lebih lanjut untuk mengetahui mekanisme fisiologis biosintesis metabolit sekunder target, seperti pada *Sorbus acupadia* (Qiu *et al.*, 2011) dan pada *Panax ginseng* (Hu *et al.*, 2003).

Santoso (2012) melaporkan penggunaan ekstrak *Saccharomyces cerevisiae* (sebagai elisitor biotik) dan CuSO_4 (sebagai elisitor abiotik) dalam elisitasi langsung pada media MS padat mampu menginduksi lebih cepat sintesis saponin. Namun, sejauh ini upaya meningkatkan kadar saponin dengan menggunakan metode kultur agregat sel pada medium cair belum pernah dilaporkan. Penelitian ini dirancang untuk mengetahui umur kalus yang tepat sebagai donor dalam kultur agregat sel *T. paniculatum* pada medium cair. Diharapkan penelitian ini mampu menjadi informasi dasar dalam pengembangan produksi saponin secara *in vitro* maupun sebagai dasar untuk mengetahui mekanisme fisiologis biosintesis saponin pada *T. paniculatum* lebih lanjut.

METODE PENELITIAN

Kalus yang berumur 3, 4, 5, dan 6 minggu setelah tanam digunakan sebagai donor dalam pembentukan agregat sel. Kalus

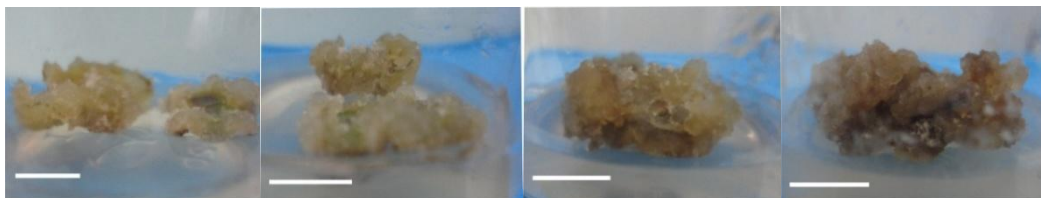


diinduksi dari daun pucuk ke 3 – 5 *T. paniculatum* yang dipotong ukuran 1,5 x 1,5 cm pada media MS padat dengan penambahan 2 ppm 2,4 D dan 1 ppm kinetin. Eksplan dikultivasi pada kondisi terang terus menerus (3500-4000 lux pada suhu $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$) dan sejumlah 0,5 g kalus dipindah secara aseptik pada botol kultur yang berisi 50 mL media MS cair dengan penambahan zat pengatur tumbuh yang sama saat induksi kalus. Kultur diinkubasi pada kondisi gelap absolut ($25 \pm 1^{\circ}\text{C}$). Setelah enam hari, kultur difiltrasi dengan kertas saring steril dan diukur biomassa kering pada suhu 70°C dan kadar saponin total dideteksi dengan KLT dan diukur dengan menggunakan menggunakan metode Hu *et al.* (2003) dengan eluen propanol : air = 14 : 3. Hasil analisis sebelumnya dilanjutkan pada tahap analisis kuantitatif dengan menggunakan peraksi *Vanillin Reagent* mengacu pada metode Makkar *et al.* (2007) yang dimodifikasi oleh Santoso (2012). Data biomassa dan kadar saponin total dianalisis dengan program *SPSS*

16 for Windows 2007 dan uji signifikansi DMRT pada derajat 5%.

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Kalus yang akan digunakan sebagai donor pada kultur cair agregat sel berhasil diinduksi dengan menggunakan daun *T. paniculatum* pucuk ketiga sampai lima pada medium MS padat dengan penambahan 2 ppm 2,4 D yang dikombinasikan dengan 1 ppm kinetin. Kalus tersebut dipanen pada umur 3, 4, 5, dan 6 minggu setelah tanam (kultivasi) dan memiliki karakteristik yang relatif berbeda (Gambar 1). Kalus yang dipanen pada umur minggu ketiga dan empat memiliki karakteristik morfologi remah, berair, jernih, dan cenderung bergerombol tidak beraturan di sekitar bekas potongan eksplan. Hal tersebut berbeda dengan kalus yang dipanen pada umur minggu ke 5 dan 6 setelah kultivasi, yaitu cenderung lebih kompak, lebih kering, warna kalus coklat muda jernih sampai coklat keruh dan hampir tidak ada eksplan yang terlihat.



Gambar 1. Karakteristik morfologi kalus yang diinduksi pada media MS padat yang berumur tiga (A), empat (B), lima (C), dan enam minggu (D) (bar = 1 cm).

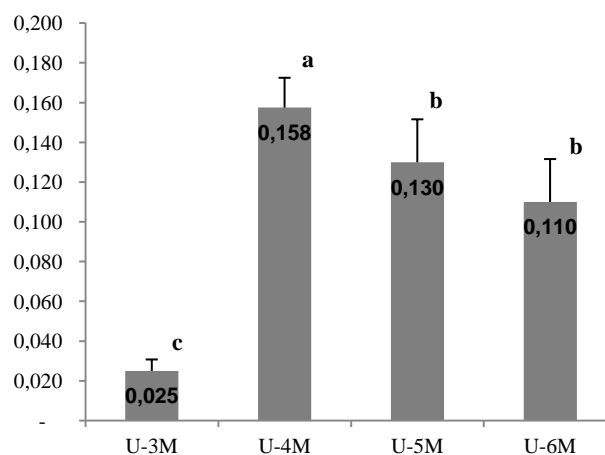
Pengaruh berbagai rentangan umur kalus sebagai donor dalam kultur agregat sel *T. paniculatum* pada medium MS cair disajikan pada Gambar 2. Berdasarkan data tersebut, kalus *T. paniculatum* yang berumur tiga minggu (U-3M) memiliki rata – rata biomassa kering yang terendah ($0,025 \times 10^{-2}$ g). Hasil demikian diduga karena sel – sel kalus masih bersifat meristematik (aktif membelah). Pada kondisi demikian, dinding sel pada sel – sel meristematik hanya bersifat *single* yang tersusun atas hemiselulosa (Teiz dan Zaiger, 2002),

sehingga mengakibatkan banyak sel – sel kalus yang dikulturkan pada medium cair mengalami lisis atau pecah akibat agitasi kuat. Hal tersebut didukung oleh Dods dan Robert (1982) bahwa sel – sel kalus meristematik akan cenderung berada pada fase mitotiknya sampai kondisi lingkungan kultur menginisiasi sel – sel tersebut untuk terdeferensiasi lebih lanjut.

Perlakuan kalus yang berumur empat minggu (U-4M) memiliki biomassa tertinggi ($0,158 \times 10^{-2}$ g). Namun, pada perlakuan berikutnya (U-5M dan U-6M) cenderung

menurun ($0,13 \times 10^{10} \text{ g}$ dan $0,11 \times 10^2 \text{ g}$). Kalus berumur empat minggu diduga memiliki struktur dinding sel yang lebih stabil dibanding dengan perlakuan U-3M. Oleh karena itu, sel – sel kalus mampu dipisah dan dikulturkan untuk dibiakkan padamedia cair dengan kondisi agitasi terus menerus. Hal tersebut berbeda dengan dengan perlakuan U-5M dan U-6M yang cenderung memiliki biomaassa yang lebih rendah dibanding dengan perlakuan U-4M. Kalus U-5M dan U-

6M yang digunakan sebagai donor kultur agregat sel, cenderung lebih kompak. Hal tersebut didukung hasil pengamatan karakteristik morfologi kalus yaitu memiliki tingkat keremahan kalus yang rendah dan warna kalus yang lebih gelap. Diduga sel – sel kalus tersebut tidak dapat memisah dengan baik walaupun diagitasi terus menerus dengan kecepatan 100 rpm selama enam minggu dan tidak mampu membelah lebih lanjut pada media cair.



Gambar 2. Biomaass kering (mg) hasil kultur agregat sel *T. paniculatum* pada hari ke enam kultivasi. Batangwarna yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda signifikan pada taraf uji DMRT pada derajat 5%.

Adapun data kadar saponin total yang diperoleh dari perlakuan pada penelitian ini tersaji pada Gambar 3. Berdasarkan data tersebut, kadar saponin total tertinggi terdapat pada perlakuan kalus yang berumur lima minggu setelah kultivasi (U-5M) yaitu mencapai 17,45 ppm/ 0,1 g sampel. Kadar saponin total pada perlakuan U-6M lebih rendah dibanding dengan perlakuan U-5M, yaitu hanya sejumlah 14,1 ppm/ 0,1 g sampel. Perlakuan dengan donor kalus yang berumur kurang dari enam minggu (U-6M), seperti U-4M dan U-3M juga memiliki kadar saponin total yang lebih rendah, yaitu 9,2 dan 4,2 ppm/ 0,1 g sampel.

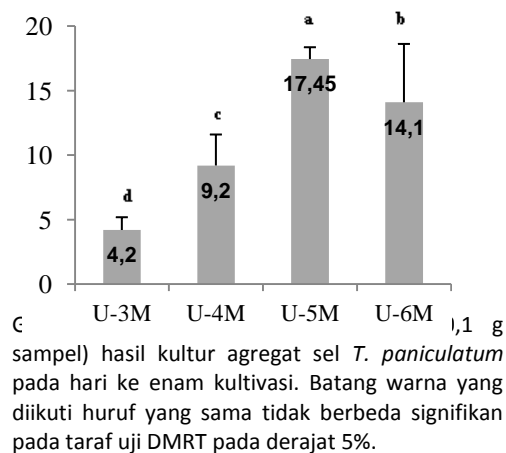
Hasil tersebut sangat berlawanan dengan data biomaassa kering terbaik hasil kultur cair agregat sel *T. paniculatum* yang dapat diperoleh pada perlakuan kalus

berumur 4 minggu setelah kultivasi (U-4M). Perbedaan kadar saponin total hasil optimasi umur kalus donor kultur agregat sel dapat disebabkan faktor fase sel – sel donor kalus yang digunakan berbeda – beda, sehingga membentuk jenis jalur sel (*line cell*) yang berbeda pula. Jenis *line cell* yang berbeda dapat menginduksi metabolit sekunder yang berbeda pula (Sharma *et al.*, 2011) dan bahkan akselerasi akumulasi senyawa target juga (Jin dan Keng, 2013). Pada kalus donor umur tiga sampai empat minggu kultivasi diduga cenderung memiliki daya mitotik yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan umur lima sampai enam minggu setelah kultivasi. Hal tersebut didukung dengan data morfologi kalus yang menunjukkan bahwa karakteristik sel – sel kalus pada minggu ketiga sampai empat adalah sangat remah,



sel – sel kalus jernih, dan berair. Hal tersebut sangat kontras dengan kalus yang digunakan sebagai donor umur lima sampai enam minggu setelah kultivasi yang lebih kompak, sel – sel kalus berwarna coklat muda dan cenderung tidak berair. Hal ini didukung oleh pendapat Pierik (1989) yang mengungkapkan bahwa sel – sel kalus yang masih memiliki kemampuan aktif mitotik antara lain berwarna jernih, bentuk tidak beraturan (*amorf*), remah, dan berair.

Namun, akhir – akhir ini perkembangan bioteknologi kultur *in vitro* tumbuhan menunjukkan hal berbeda. Kondisi fase sel – sel yang dikulturcairkan untuk memproduksi metabolit sekunder target dapat dimonitoring dengan menggunakan teknologi flositometri. Penelitian yang dilakukan oleh Stancheva *et al.* (2011) menunjukkan bahwa profil kondisi sel – sel pada kultur suspensi sel *Harpagophytum procumbens* untuk memproduksi beberapa senyawa *phenylethanoid glycosides* cenderung didominasi sel – sel dalam kondisi G0/G1. Hal senada juga dilaporkan oleh Chaco *et al* (2010) yang melaporkan bahwa sel – sel *Sylibum pamyranum* untuk memproduksi *sylymarin* pada kultur cair selama 72 jam didominasi berpada pada fase G0/G1. Oleh karena itu, diperlukan penelitian lebih lanjut yang tidak hanya mencari optimasi jumlah inokulum dan kecepatan agitasi saja, namun juga bagaimana memonitoring profil fase – fase sel yang sedang dikulturkan beserta kinetiknya.



ε (1,1 g sampel) hasil kultur agregat sel *T. paniculatum* pada hari ke enam kultivasi. Batang warna yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda signifikan pada taraf uji DMRT pada derajat 5%.

SIMPULAN, SARAN, DAN REKOMENDASI

Pada perlakuan dengan menggunakan kalus berumur empat minggu sebagai donor kultur agregat sel *T. paniculatum* memiliki biomassa kering tertinggi ($0,16 \times 10^{-2}$ g) dibanding dengan perlakuan lainnya. Namun, kadar saponin total diperoleh pada perlakuan kalus yang berumur 5 minggu yaitu sejumlah 17,45 ppm. Saat ini sedang dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mencari optimasi kecepatan agitasi (rpm) dan jumlah inokulum (kalus donor) terhadap morfologi agregat sel, biomassa, interval waktu pemanenan, kadar saponin, kinetiknya serta elisitasi pada kultur cair agregat sel.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini merupakan sebagian hasil dari Penelitian Hibah Desentralisasi, oleh karena itu, diucapkan terima kasih kepada Direktorat Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat (DP2M) DIKTI atas bantuan dana Hibah Desentralisasi Tahun Anggaran 2014 yang diberikan kepada penulis untuk menyelesaikan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Cacho, Margarita., Alexis T. Dominguez., J.A.E. Rosselo (2010) *Are Polyamines Directly Involved in Silymarin production in The Milk Thistle (Silybum marianum, (L) Gaertn)?*. Plant Tissue Organ Culture Journal. Spinger. Volume 103, p.361-368.
- Doods, J.H. and Roberts L.W. (1982) *Experiment in Plant Tissue Culture*. United State of America: Cambrige University Press.
- Hu, X.Y., Neill, S.J., Cai, W-M., and Tang, Z-C. (2003) The mediation of defense responses of ginseng cells to an elicitor from fungal cell walls of *Colletotrichum lagenarium* by plasma membrane NAD(P)H oxidases. *Acta Botanica Sinica*. 45 (1): 32-39.
- Jin, C.S. dan Keng, C.L. (2013) Factors Afecting the Selection of Callus Cell Lines and the Preparations of the Cell Suspension Culture of *Artimissea annua* L. *Plant. Tissue Cult. & Biotech*. 23 (2): 157 – 163.
- Makkar, H.P.S., Siddhuraju, P., Becker, K. (2007) *Plant Secondary Metabolite*. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc.
- Pierik, R. L. M. (1989) *In Vitro Culture of Higher Plants*. Netherland: Martinus Nijhoff Publisher, Dordrecht.
- Qiu, X., Lei, C., Huang, L., Li, X., Hao, H., Du, Z., Wang, H., Ye., H., Beerhues, L., and Liu, B. (2011) Endogenous hydrogen peroxide is a key factor in the yeast extract induced activation of biphenil biosynthesis in cell cultures of *Sorbusaucuparia*. *Planta*.
- Stancheva, Nina., Weber, J., Schulze, J., Alipieva, K., Ludwig, J., Hass, C., Georgiev, V., Bley, T., Gioegiev, M. (2011) *Phytochemical and Flow Cytometric Analyses of Devil's Claw Cell Cultures*. Plant Tissue Organ Culture Journal. Spinger. Volume 105, p.79-84.
- Rahmi, Eriani, K., dan Widyasari. (2011) Potency of java ginseng (*Talinum paniculatum* Gaertn.) root extract on quality and viability of mice sperm. *Jurnal natural*. 11 (1): 7-10.
- Saroni, N., Y. Astuti, dan Adjirni. (1999) Pengaruh infus akar som jawa (*Talinum paniculatum*) terhadap jumlah dan motilitas spermatozoa pada Mencit. *Warta Tumbuhan Obat Indonesia*. 5 (4): 13-14.
- Sharma, M., Sharma, A., Khumar, A., Basu, S.K. (2011) Enhancement of secondary metabolites in cultured plant cell throught stress stimulation. *American Journal of Plant Physiology*. 6 (2): 50-71.
- Sumastuti, R. (1999) Efek anti radang infus daun dan akar som jawa (*T.paniculatum*) pada tikus putih *in Vitro*. *Warta Tumbuhan Obat Indonesia*. 5 (4): 15-17.
- Teiz and Zeiger. (2002) *Plant Physiology*. Sunderland: Sinauer Publishing.
- Winarni, D. (2009) Potensi androgenik akar ginseng jawa (*Talinum paniculatum* Gaertn.) pada kondisi testosteron rendah. *Disertasi*. Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Airlangga Surabaya.

TANYA JAWAB

Penanya : Siti Chalimah (UMS)

Pertanyaan :

- Apa yang akan dicapai dalam penelitian tersebut ?
- Dari penjelasan dalam presentasi di sebutkan ada sel yang berbeda , Apa yang berbeda? Bentuk atau aktivitasnya ?
- Mengapa daun sebagai sumber eksplan ?
- Setelah ditemukan hasilnya, apa tahap berikutnya ?
- Mengapa tidak dikembangkan skala lapangan?

Jawaban :

- Penelitian ini bertujuan untuk mencari umur kalus yang sesuai sebagai donor sel pada kultur agregat sel sebagai dasar untuk
- mengoptimalkan produk sisa ponin dengan kultur agregat sel.
- Yang berbeda adalah kondisi atau profil fase sel yang dapat berada S, G0, G1 atau G2 yang dapat diketahui dengan alat flosiometri.
- Walaupun saponin diproduksi padasel-sel umbi akar, sel-sel kalus yang diinduksi dari eksplan daun tetap memiliki potensi untuk diinduksi menjadi organ lain atau jaringan lain termasuk aktivitas selnya, contoh serupa pada tanaman kina .

Dapat digunakan sebagai dasar untuk bahan referensi optimalisasi kondisikultur agregat sel, dimana sel-sel yang dikulturkan berada pada kondisi *line-cell* yang tepat agar optimal dalam memproduksi saponin. Banyak kendala, misalnya adalah : waktu panen. Contohnya adalah pada *Panax ginseng* masa panen mencapai 2-5 tahun. Selain itu *Aneaman nematode* dan hama yang mengakibatkan umbi akar busu

