

Respon Pertumbuhan dan Produksi Senyawa Antioksidan pada Kalus *Hibiscus sabdariffa* L. dari Eksplan yang Berbeda secara *in vitro*

Agustin Noviati, ¹Yulita Nurchayati, Nintya Setiari
Laboratorium Biologi Struktur dan Fungsi Tumbuhan FSM UNDIP
Email: yulita.yoko@gmail.com

ABSTRACT

Ascorbic acid and carotenoid are secondary metabolites found in roselle, which show antioxidant activity. These compounds can be obtained from callus induced by several kinds of explants. The aims of this experiment is to study callus growth from explants which can encourage high level of antioxidant compounds. The callus was obtained from difference organ, i.e. section of leaf, petiole and flower sepal. Sterilized explants were planted in MS (Murashige&Skoog) combined with 2 mg/L Naphtalene Acetic Acid (NAA) dan 5 mg/L Benzyl Adenin (BA). This experiment has been conducted by completely randomized design with 5 replicates. Besides fresh weight callus, callus respons from each explants were analyzed descriptively. Ascorbic acid and carotenoid content were analyzed qualitatively and quantitatively by titration and spectrophotometric respectively. The results showed that all kinds of explant dedifferentiated into callus which antioxidant content. Callus from leaf section had the highest fresh weight with high level ascorbic acid. Whereas the highest carotenoid level was obtained from callus-derived flower sepals. It concluded that *in vitro* callus was useful for producing plant biochemical compounds.

Keywords : Callus induction, antioxidant agents, explants, ascorbic acid, cartenoid

PENDAHULUAN

Rosela (*Hibiscus sabdariffa* L.) merupakan tanaman yang memiliki banyak manfaat antara lain penghasil serat untuk pembuatan tali, sedangkan bunganya bermanfaat sebagai bahan makanan dan minuman (Maryanti & Kristiana, 2008). Kandungan gizi pada kelopak bunga rosela adalah pigmen antosianin yang membentuk flavonoid yang berperan sebagai antioksidan, vitamin C, vitamin A dan 18 asam amino yang diperlukan tubuh, termasuk arginin dan lisin yang berperan dalam proses peremajaan tubuh. Daun dan tangkai daun rosela juga memiliki kandungan gizi yang cukup baik sehingga rosela tidak hanya berpotensi sebagai bahan baku industri makanan dan minuman, tetapi juga berpotensi digunakan sebagai bahan baku industri farmasi, pewarna alami dan kosmetik (Mardiah, 2009). Tingginya kandungan senyawa yang bermanfaat tersebut dapat diproduksi melalui teknik induksi kalus. Beberapa penelitian terkait produksi senyawa metabolit tumbuhan antara lain senyawa antioksidan vitamin C pada kalus *Morinda citrifolia* (Kusdianti, 2007), kandungan klorofil

dan karotenoid dari kultur kalus *Acalypha indica* L. (Rahayu, 2002). Siregar (2006) telah melakukan penelitian mengenai penggunaan eksplan daun, petiola dan batang dari tanaman pasak bumi tampak menghasilkan pertumbuhan dan kandungan alkaloid yang berbeda.

Kalus dapat digunakan sebagai tempat produksi metabolit sekunder sebagai upaya penyediaan senyawa bioaktif tumbuhan. Pada penelitian ini, eksplan yang digunakan adalah potongan daun, tangkai daun, dan kelopak bunga rosela. Kalus dari beberapa jenis eksplan ini diharapkan dapat menjadi jaringan penghasil senyawa antioksidan vitamin C dan karotenoid.

BAHAN DAN METODE

Penyediaan Eksplan

Eksplan yang digunakan adalah eksplan dari rosela, yaitu daun, tangkai daun dan kelopak bunga rosela yang masih kuncup pada urutan ke-3 dari pucuk. Eksplan dicuci dengan air mengalir dan deterjen untuk direndam dalam larutan antibakteri selama 5 menit dibilas dengan akuades. Eksplan selanjutnya disterilisasi dengan larutan Na hipoklorit 5 % dan dibilas dengan akuades steril 3 kali. Masing-masing eksplan

dipotong-potong dengan ukuran 1x1 cm², dan tangkai daun sepanjang 1 cm, selanjutnya ditanam pada media MS yang dikombinasi dengan 2 mg/L NAA dan 5 mg/L BAP. Kultur diinkubasi dalam ruangan steril pada pencahayaan lampu TL 10 watt. Kalus yang sudah tumbuh disubkultur sebanyak 2 kali, setiap 14 hari sekali.

Analisis Pertumbuhan

Pertumbuhan kalus diwakili dengan berat basah kalus berumur 42 hari yang ditimbang dengan menggunakan neraca analitik.

Persentase eksplan yang tumbuh dihitung mengikuti rumus:

$$\frac{\text{Jumlah eksplan yang tumbuh tiap perlakuan}}{\text{Jumlah ulangan tiap perlakuan}} \times 100\%$$

Analisis kandungan asam askorbat

Kandungan asam askorbat di dalam jaringan dianalisis dengan metode titrasi iodometri. Kalus digerus dengan mortar, sampel yang sudah digerus (*slurry*) diambil dan dimasukkan dalam labu ukur 50 mL. Akuades ditambahkan sampai volume mencapai 50 mL, lalu disaring dengan kertas saring. Filtrat 10 mL ditambah dengan 2 mL larutan amilum 1% dititrasi dengan larutan iodine standar 0,01 N sampai larutan berwarna biru. Penghitungan kandungan asam askorbat ditentukan dengan rumus:

$$\text{Kandungan asam askorbat} = \frac{\text{Volume pengenceran} / \text{titrat} \times 0,88 \times b}{A}$$

Konversi :1 mL iodine terpakai = 0,88 mg vitamin C (Sudarmadji, 1989)

Keterangan:

b= rata-rata hasil titrasi (mL)

A= berat sampel (g)

Analisis kandungan karotenoid

Kandungan karotenoid diukur dengan menggunakan metode spektrofotometri. Kalus sebanyak 0,1 g diekstraksi dengan 10 mL aseton 80% diaduk hingga karotenoid larut. Ekstrak disaring dengan menggunakan kertas saring dan dimasukkan dalam tabung cuvet. Analisis karotenoid dengan spektrofotometer UV Vis Mini 1240 Shimadzu dilakukan pada panjang gelombang 480 nm, 645 nm, dan 663 nm. Penghitungan kandungan karotenoid dilakukan berdasarkan rumus:

$$\text{Karotenoid } (\mu\text{mol/L}) = \frac{(A_{480} + (0,114 \times A_{663})) - (0,638 \times A_{645} \times V \cdot 10^3)}{112,5 \times W}$$

Konversi $\mu\text{mol/L} = 27,25 \text{ mg/L}$ (Hendry & Grime, 1993).

Keterangan:

A480 = absorbansi pada panjang gelombang 480 nm

A645 = absorbansi pada panjang gelombang 645 nm

A663 = absorbansi pada panjang gelombang 663 nm

V = volume ekstrak (mL)

W = berat sampel (g)

HASIL DAN PEMBAHASAN

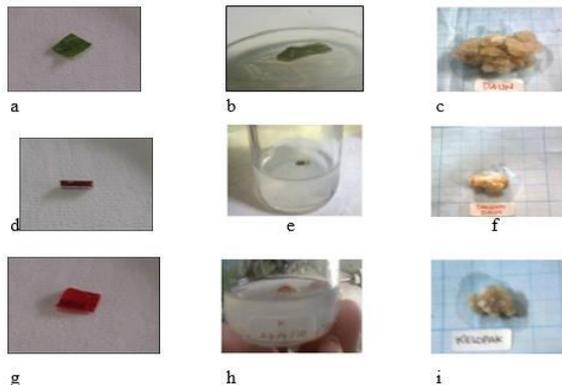
Respon pertumbuhan yang pertama diamati adalah waktu inisiasi kalus dari ketiga jenis eksplan. Eksplan dari daun paling cepat membentuk kalus (4 hari) dibandingkan dengan tangkai daun (7 hari) dan kelopak bunga (6 hari). Hal ini dikarenakan daun memiliki morfologi yang tipis, sehingga memudahkan sel-sel penyusunnya untuk menyerap unsur hara dari media. Sel-sel tersebut kemudian akan mendapatkan energi dan nutrisi yang akan digunakan untuk pembentangan dan pembelahan sel untuk membentuk kalus. Menurut Chawla (2002), kalus merupakan massa jaringan hasil proliferasi sel yang belum terdiferensiasi. Semakin luas permukaan irisan eksplan maka kalus yang terbentuk semakin banyak. Kalus tersebut muncul pada permukaan eksplan, terutama yang mengalami luka bekas irisan, ditandai dengan membengkaknya eksplan dan munculnya agregat sel berwarna putih.

Tabel 1. Rerata waktu inisiasi (hari), berat segar (g), warna kalus dan prosentase pembentukan kalus rosela dari 3 jenis eksplan pada media MS dengan kombinasi 2 mg/L NAA dan 5 mg/L BAP

| Jenis eksplan | Waktu inisiasi (hari) | Berat segar (g) | Warna kalus | Persentase pembentukan kalus |
|---------------|-----------------------|-----------------|--------------|------------------------------|
| Daun | 4c | 1,76a | Kuning pucat | 100 % |
| Tangkai Daun | 7a | 0,31b | Kuning pucat | 100 % |
| Kelopak Bunga | 6b | 0,51b | Kuning pucat | 100 % |

Ket: Angka-angka dalam kolom yang diikuti abjad yang sama menunjukkan hasil uji DMRT pada signifikansi 95%

Eksplan yang berasal dari tangkai daun, memerlukan waktu lebih lama dalam pembentukan kalus. Hal ini diduga berkaitan dengan proses penyerapan unsur hara. Tangkai daun merupakan modifikasi dari batang sehingga jaringannya lebih kompleks daripada daun dan kelopak bunga, selain itu sel-selnya mengalami penebalan sekunder oleh zat lignin. Menurut Wulandari (2004), sel-sel pada bagian korteks maupun empulur tangkai daun tersusun rapat, selain itu pada sebagian dinding selnya terdiri dari zat kayu (lignin) yang menyebabkan kekakuan pada sel. Sementara kelopak bunga rosela yang berwarna merah, strukturnya merupakan modifikasi daun tetapi morfologinya lebih tebal, sehingga tidak semua sel cepat menyerap unsur hara seperti sel pada daun. Hal ini menyebabkan waktu inisiasi kalus dari kelopak bunga lebih lama dari daun, namun lebih cepat dari tangkai daun (Tabel 1).



Gambar 1. Tahap pembentukan dan pertumbuhan tiap eksplan selama 0-6 minggu. a, b, dan c eksplan dan kalus dari daun, d, e, dan f eksplan dan kalus dari tangkai daun, g, h, dan i eksplan dan kalus dari kelopak bunga

Warna kalus rosela yang diamati dari semua eksplan adalah warna kuning pucat. Hal ini menunjukkan plastida pada kalus dalam bentuk kromoplas telah berkembang. Selain itu, kalus yang dihasilkan dari semua eksplan adalah kalus remah dan tidak terbentuk kalus kompak (Gambar 1). Tipe kalus remah ini serupa dengan kalus dari daun jati belanda, bahkan prosentase pembentukan kalus remah tersebut mencapai 95% (Syahid, 2008). Kalus dengan struktur remah (*friable*) merupakan kalus yang terbentuk dari sekumpulan sel yang mudah lepas, terpisah-

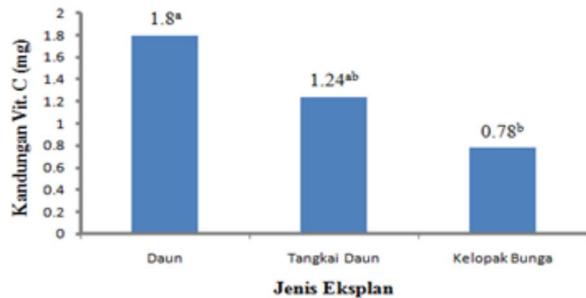
pisah menjadi bagian yang kecil-kecil dan mengandung banyak air.

Eksplan daun menghasilkan kalus dengan berat segar tertinggi dibandingkan dengan dua eksplan lainnya. Daun yang masih muda merupakan tempat sintesis auksin. Auksin tersebut berfungsi untuk merangsang dan mempercepat pembelahan sel, sehingga tampak ada perbedaan kemampuan pembentukan kalus dari ketiga jenis eksplan yang akhirnya mempengaruhi berat kalus. Selain itu, kecepatan pertumbuhan tiap organ berbeda. Secara genetis, daun tersusun oleh mesofil dengan dinding sel yang tipis, sedangkan tangkai daun didominasi oleh jaringan pengangkut. Kelopak bunga tersusun atas mesofil yang mirip daun namun lebih tebal.

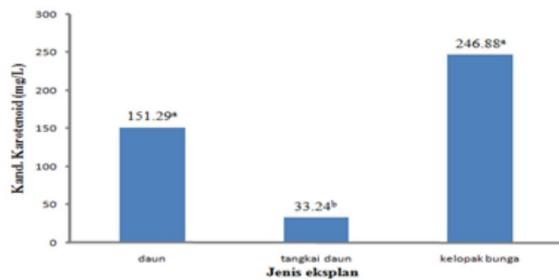
Produksi asam askorbat dan karotenoid pada kultur kalus

Kandungan asam askorbat maupun karotenoid pada kalus rosela disajikan pada Tabel 1. Berdasarkan analisis statistik tampak bahwa perbedaan kandungan asam askorbat pada kalus dari eksplan tangkai daun dengan daun tidak signifikan. Demikian pula perbedaan antara kalus dari eksplan tangkai daun dengan kalus dari kelopak bunga. Eksplan daun mampu diinduksi membentuk kalus yang menghasilkan asam askorbat tertinggi dibandingkan dengan tangkai daun dan kelopak bunga. Daun merupakan organ fotosintetik utama yang dapat menyediakan karbohidrat sebagai senyawa prazat dalam pembentukan vitamin C. Vitamin C (asam askorbat) pada tumbuhan terbentuk dari sukrosa yang dihidrolisis menjadi glukosa dan fruktosa dari suatu monosakarida (Manitto, 1981). Glukosa dan fruktosa ini selanjutnya akan masuk ke dalam jalur biosintesis vitamin C melalui jalur asam D-glukoronat dan L-gulonat (Mannito, 1981). Lain halnya dengan tangkai daun yang merupakan organ penghubung dengan fungsi utama sebagai organ transport. Jaringan penyusun tangkai daun mengalami penebalan sehingga metabolismenya tidak setinggi parenkim. Kelopak bunga merupakan modifikasi dari daun dengan fungsi spesifik yaitu sebagai penimbun karotenoid. Maryanti dan Kristiana (2008) menambahkan bahwa per g daun rosela mengandung asam askorbat sebanyak 0,54 mg sedangkan kelopak bunganya 0,14 mg. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa per g kalus

dari daun rosela mengandung asam askorbat sebanyak 1,8 mg, kalus dari tangkai daun 1,24 mg, dan kalus dari kelopak bunga 0,78 mg. Tampak bahwa asam askorbat yang dihasilkan pada kalus dari ketiga jenis eksplan lebih tinggi dibandingkan dengan tanaman induk. Jadi, kalus yang terbentuk dari ke-3 jenis eksplan tersebut dapat digunakan untuk produksi senyawa bioaktif antioksidan.



Gambar 2. Kandungan vitamin C kalus (mg) dari 3 eksplan rosela pada media MS dengan kombinasi 2 mg/L NAA dan 5 mg/L BAP



Gambar 3. Kandungan karotenoid dalam kalus (mg/L) dari 3 eksplan rosela pada media MS dengan kombinasi 2 mg/L NAA dan 5 mg/L BAP

Jenis eksplan berpengaruh secara signifikan terhadap kandungan karotenoid kalus. Kalus dari kelopak bunga mempunyai nilai rerata karotenoid yang paling tinggi, yaitu 246,88 mg/L dibandingkan dengan kalus dari daun (151,29 mg/L) dan kalus dari tangkai daun (33,24 mg/L). Karotenoid tertentu (terutama violaxantin, yang termasuk xantofil) ditemukan pada membran kloroplas yang menyebabkan warna kekuningan. Beta karoten dan lutein xantofil merupakan karotenoid terbanyak di tilakoid sebagian besar tumbuhan (Salisbury dan Ross, 1995). Pigmen-pigmen di dalam lamela kloroplas sebagian besar berupa dua macam klorofil (a dan b) dan dua macam pigmen kuning sampai oranye yang diklasifikasikan sebagai karotenoid (karoten dan xantofil) (Gardner, 1991). Oleh karena itu, selain

fungsi fotosintetiknya, daun juga menjadi tempat biosintesis karotenoid yang kemudian diakumulasikan ke dalam kelopak bunganya. Hal ini berarti secara *in vivo* kelopak bunga sudah mengandung karotenoid paling tinggi diantara eksplan-eksplan yang lain. Menurut Salisbury dan Ross (1995), kandungan karotenoid pada tanaman mencapai nilai tertinggi sebelum berbunga. Setelah tanaman menghasilkan bunga maka karotenoid akan diakumulasi pada bunga tersebut. Kelopak bunga sebagai bahan eksplan untuk induksi kalus, mampu menghasilkan karotenoid tertinggi, karena karotenoid pada kalus tidak dapat ditransport ke organ lain.

Kalus dari daun maupun tangkai daun yang ditumbuhkan pada medium MS dengan 2 mg/L NAA dan 5 mg/L BAP menghasilkan kandungan karotenoid lebih rendah daripada kelopak bunga. Daun rosela berwarna hijau, karena dalam plastida daun lebih banyak mengandung klorofil daripada pigmen karotenoid, sehingga kalus yang tumbuh diduga lebih banyak mengandung klorofil dibandingkan karotenoid. Hasil tersebut tidak serupa dengan penelitian Rahayu (2002), yang melaporkan pembentukan kalus dari daun *Acalypha indica* L. dengan menggunakan 2,4 diklorofenoksiasetat (2,4 D), ternyata kalus tersebut tidak mengandung karotenoid. Hal ini menunjukkan adanya peran zat pengatur tumbuh yang menjadi faktor penting dalam metabolisme tumbuhan.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa cuplikan sampel kalus dari daun, tangkai daun, dan kelopak bunga berturut-turut seberat 0,1 g menghasilkan karotenoid sebanyak 151,29 mg/L, 33,24 mg/L, dan 246,88 mg/L. Tingginya karotenoid pada kalus dari kelopak bunga mengindikasikan adanya suplai bahan baku karotenoid berupa sukrosa dari dalam medium kultur. Serupa dengan hasil pertama, kalus dari ke-3 jenis eksplan tersebut dapat digunakan untuk produksi karotenoid.

KESIMPULAN

Hasil penelitian mengenai produksi vitamin C dan karotenoid kalus rosela secara *in vitro* dari eksplan berbeda dapat disimpulkan bahwa eksplan daun menghasilkan kalus dengan kandungan vitamin C tertinggi, sedangkan kalus dari eksplan kelopak bunga menghasilkan karotenoid yang tertinggi.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Ausich, R.L. 1997. Commercial Opportunities for Carotenoid Production by Biotechnology. *Pure Appl. Chem.* 69: 2169-2173.
- [2] Chawla, H.S. 2003. Plant Biotechnology Laboratory Manual for Plant Biotechnology. Oxford dan IBH Publishing. New Delhi.
- [3] Davey, M.W, Kenis K, dan Keulemans, J. 2006. Genetic Control of Fruit vitamin C content. *Plant Physiology* 142: 343-351.
- [4] Gardner, F. P., Brent, P. dan Roger, L. M. 1991. Physiology of Crop Plant. *Alih bahasa*: Herawati Susilo. UI Press. Jakarta.
- [5] Giovannoni, J. J. 2007. Completing a Pathway to plant Vitamin Synthesis. The National Academy of Sciences of the USA. *PNAS journal* 104: 9190-9110.
- [6] Harborne, J.B. 1987. Metode Fitokimia. ITB Press. Bandung.
- [7] Hendry, G.A.F dan Grime, J.P. 1993. Methods In Comparative Plant Ecology. Capman & Hall. London.
- [8] Ibrahim, M. S. D. 2010. Pengaruh umur eksplan terhadap keberhasilan pembentukan kalus embriogenik pada kultur meristem jahe (*Zingiber officinale* Rosc). *Jurnal Littri*. 16 (1): 37 - 42.
- [9] Kusdianti. 2007. Kandungan Metabolit Sekunder dalam Kalus Mengkudu (*Morinda citrifolia*). *Jurnal pertanian* 1: 1-15.
- [10] Manitto, P. 1981. Biosintesis Produk Alami. Ellis harwood Ltd., Publisher. UK.
- [11] Maryanti, H. dan Kristiana. 2008. Khasiat dan Manfaat Rosela. PT. Agro Media Pustaka. Jakarta.
- [12] Rahayu, B. 2002. The effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) on callus growth and production flavonoid content on culture callus *Acalypha indica* L. *Journal Biopharmacy* 1 (1): 1-6.
- [13] Salisbury, F.B., dan Ross, C.W. 1995. Fisiologi Tumbuhan Jilid 2. ITB. Bandung.
- [14] Siregar, L.A. 2006. The Growth and Accumulation of Alkaloids in Callus and Cell Suspension of *Eurycoma longifolia* Jack. *Kultura* 41 (1): 19-27.
- [15] Smirnoff, N. 1996. The Function and Metabolism of Ascorbic Acid in Plants. *Annals of Botany* 78: 661-669.
- [16] Sudarmadji, S. 1989. Prosedur Analisa Untuk Bahan Makanan dan Pertanian. Edisi Ketiga. UGM. Yogyakarta.
- [17] Syahid, S.F. 2008. Pengaruh Komposisi Media Terhadap Pertumbuhan Kalus dan Kadar Tannin dari Daun Jati Belanda (*Guazuma ulmifolia Lamk*) Secara in vitro. *Jurnal Littri* 16 (1): 1-5.
- [18] Trigiano, R. N. dan D.J. Gray. 2000. Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory exercises. 2nd Adt. CRC Press. New York.
- [19] Wulandari, S. 2004. Respon Eksplan Daun Tanaman Jeruk Manis (*Citrus sinensis*) Secara In vitro Akibat Pemberian NAA dan BA. *Jurnal Biogenesis* 1 (1): 21-25.