

Elisitasi Kultur Sel Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb) untuk Produksi Senyawa Aktif Xantorizol

*Elfahmi, Syaikhul Aziz dan Akbar Dana

Sekolah Farmasi, Institut Teknologi Bandung, Jl. Ganessa 10 Bandung, 40132

Abstrak

Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) merupakan salah satu tanaman asli Indonesia yang telah digunakan untuk tujuan pengobatan. Xantorizol, senyawa sesquiterpenoid dari temulawak, telah banyak diteliti aktivitasnya. Kandungan senyawa xantorizol dari tanaman ini sangat kecil dan waktu panen relatif lama. Untuk mengoptimalkan produksi xantorizol, teknik kultur jaringan tanaman dapat digunakan sebagai salah satu alternatif. Penelitian ini ditujukan untuk meningkatkan kadar xantorizol dari kultur suspensi sel temulawak menggunakan elisitor. Kultur kalus yang telah diinisiasi pada media padat diinduksi menjadi suspensi sel dengan media cair. Kultur suspensi sel yang berumur dua minggu dan dielisitasi dengan ekstrak ragi. Kultur dipanen pada minggu pertama dan kedua setelah perlakuan dan dikeringkan. Sampel kering diekstraksi dengan etil asetat dan dianalisis dengan KCKT. Hasil analisis menunjukkan bahwa kultur yang dielisitasi dengan ekstrak ragi 100 ppm dapat menstimulasi pembentukan xantorizol sebesar 0,186%.

Kata kunci: *Curcuma xanthorrhiza* Roxb., ekstrak ragi, kultur suspensi sel, temulawak.

Abstract

Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) is the one of indigenous plants in Indonesia that has been used for medicinal purpose. Xanthorrhizol, a sesquiterpenoid compound from temulawak, was studied for various activities. Xanthorrhizol content in this plant is very low and relatively have long time for harvest. For optimize the production of xanthorrhizol, tissue culture technique could be used as an alternative. The aim of this research was carried out by to enhance the production of xanthorrhizol from cell suspension cultures using elicitors. The initiated callus cultures from solid medium, was induced to suspension cell cultures in liquid medium. The suspension cell culture was grown for two weeks and elicited with yeast extract. The cultures were harvested on the first and second weeks after elicited. Dry sample was extracted by ethyl acetate as a solvent and analyzed by HPLC. The results showed for elicited culture by yeast extract 100 ppm could stimulate production of xanthorrhizol by 0.186%.

Keywords: *Curcuma xanthorrhiza* Roxb., yeast extract, cell suspension culture, temulawak.

Pendahuluan

Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) merupakan salah satu tanaman dari suku Zingiberaceae yang banyak tumbuh di Indonesia. Xantorizol merupakan senyawa golongan sesquiterpenoid yang pernah diisolasi dari temulawak, dan telah banyak diteliti aktivitasnya seperti antibakteri, antikanker, fitoestrogen, antijamur, antihiperlipidemia dan hepatoprotektor (Anggakusumah et.al. 2009, Kim et. al. 2004, Rukayadi et.al. 2006). Melihat potensinya yang besar, maka penelitian tentang tanaman ini terus berkembang. Salah satu permasalahan dalam produksi senyawa aktif dari tanaman ini adalah umur optimal temulawak yang siap dipanen cukup panjang berkisar 10-12 bulan dan hanya sedikit mengandung xantorizol yaitu sekitar 0,2 % (Hwang et al., 2000).

Dalam upaya meningkatkan kandungan xantorizol dalam temulawak, teknik kultur jaringan dapat

digunakan sebagai cara untuk meminimalkan waktu panen dan meningkatkan kandungan metabolitnya. Teknik ini memiliki prospek yang lebih baik dibandingkan metode perbanyakan tanaman secara vegetatif konvensional. Tumbuhan memiliki berbagai macam metode pertahanan terhadap serangan patogen. Resistensi terhadap serangan patogen dilakukan dengan sistem yang alami (*native*) pada tumbuhan tersebut ataupun sistem pertahanan yang diinduksi. Respon pertahanan yang dapat diinduksi tersebut dipicu dengan pengenalan dengan faktor kimia yang disebut elisitor. Faktor kimia tersebut dapat berupa biotik dan abiotik. Pemberian senyawa elisitor tersebut dapat digunakan untuk meningkatkan kadar metabolit sekunder (Broeckling et. al. 2005). Penelitian ini bertujuan untuk meningkatkan kadar metabolit sekunder (xantorizol) dari kultur suspensi sel temulawak menggunakan elisitor biotik (ekstrak ragi).

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

Percobaan

Pembuatan Media Kultur: Media yang digunakan adalah Murashige-Skoog dengan penambahan sukrosa 3 % dan variasi zat pengatur tumbuh (ZPT) 2,4-D dengan konsentrasi 0,1 dan 0,4 ppm serta IBA dengan konsentrasi 0,1 dan 0,4 ppm. pH media yang digunakan 5,8.

Kurva Pertumbuhan Sel: Kurva pertumbuhan dibuat untuk melihat pengaruh waktu (umur kultur) terhadap berat kering. Berat kering diperoleh setelah sel dikeringkan dengan oven hingga mencapai berat konstan. Pengujian kurva pertumbuhan diperoleh dengan menumbuhkan kultur hingga berumur 5 minggu.

Elisitasi: Elisitasi dilakukan menggunakan elisitor biotik (ekstrak ragi). Ekstrak ragi yang diberikan 100, 500 dan 1000 ppm. Ekstrak ragi diberikan pada kultur yang berumur dua minggu. Sebagai kontrol, terdapat kultur tanpa pemberian ekstrak ragi. Kultur dipanen pada saat berumur tiga dan empat minggu.

Ekstraksi: Kultur suspensi sel dikeringkan dengan *freeze-drying*. selanjutnya sel kultur diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut etil asetat. Ekstrak disaring dan dikeringkan pelarutnya dengan rotavapor.

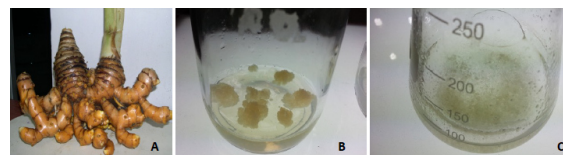
Analisis Kadar Xantorizol: Ekstrak dianalisis kandungan xantorizolnya dengan KCKT (kolom C18, ukuran partikel 5 μm , 4,6x150 mm). Elusi dilakukan secara isokratik (metanol-air perbandingan 85:15) dengan laju alir 0,8 mL/menit dan suhu kolom 35°C selama 8 menit. Kurva kalibrasi standar xantorizol dibuat seri konsentrasi dengan konsentrasi 10, 15, 20, 25 dan 30 ppm

Hasil dan Pembahasan

Kultur yang telah dibudidayakan di laboratorium, berupa kultur kalus di media padat, dipindahkan ke media cair dan dilakukan optimasi media yang menghasilkan suspensi sel terbaik. Media cair yang digunakan selanjutnya dioptimalisasi komposisinya dengan berbagai ZPT. Setelah ditumbuhkan selama empat minggu, kultur yang tumbuh dengan optimal dalam bentuk suspensi sel adalah kultur dengan media mengandung hormon 2,4-D 0,4 ppm. Media dengan komposisi tersebut selanjutnya digunakan sebagai media untuk perbanyakan.

Hormon 2,4-D merupakan hormon auksin yang biasanya diperlukan untuk inisiasi induksi kalus dari eksplan. Kultur pada media yang mengandung auksin cenderung menghasilkan suspensi sel sedangkan pada media yang mengandung sitokinin

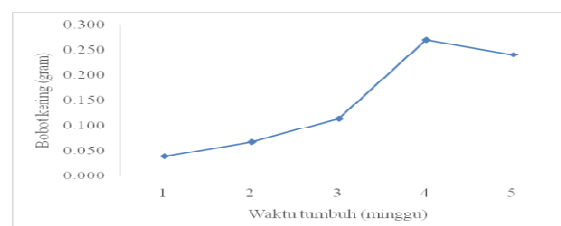
cenderung menghasilkan agregasi sel. Uji pendahuluan untuk mengetahui komposisi media yang optimal untuk pertumbuhan kultur perlu dilakukan karena kebutuhan nutrisi untuk pertumbuhan optimum sangat berbeda pada tiap spesies tumbuhan. Komposisi media yang optimal dapat membantu perkembangan dan regenerasi kultur tersebut.



Gambar 1. Umbi tanaman temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb) (A), kultur kalus media padat (B) dan kultur suspensi sel (C)

Media cair sering digunakan untuk kultur suspensi yang ditujukan untuk produksi metabolit sekunder. Kultur suspensi sel perlu dilakukan *shaker* agar mendapatkan nutrisi yang merata di setiap bagian media. Selain hal tersebut, pada proses penumbuhan kultur, densitas inokulum pada kultur harus dijaga agar kultur bisa tetap hidup. Beberapa senyawa yang penting dapat keluar dari sel ke dalam media, seperti alkaloid, asam amino, enzim, senyawa untuk pertumbuhan dan vitamin (Street, 1973). Jumlah yang keluar tidak begitu berarti ketika terdapat banyak sel yang tumbuh dalam jarak yang dekat (densitas tinggi).

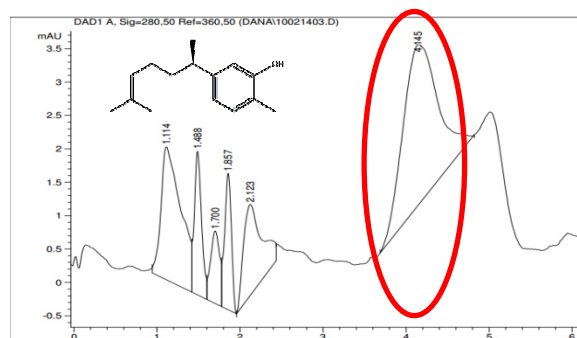
Kurva pertumbuhan kultur dapat digunakan untuk mengetahui kapan waktu pertumbuhan kultur berlangsung efektif. Dengan mengetahui kurva pertumbuhan kultur, waktu untuk subkultur yang optimal dapat ditentukan. Kurva pertumbuhan menunjukkan bahwa suspensi sel temulawak dapat tumbuh dengan secara perlahan pada pekan pertama setelah inkubasi, dan kecepatan pertumbuhan meningkat tajam pada pekan ke 2 dan 3 sampai mencapai pertumbuhan optimal pada pekan ke 4, selanjutnya pekan ke 5 pertumbuhan sel sudah mulai menurun.



Gambar 2 Profil kurva pertumbuhan kultur suspensi sel temulawak

Pada penelitian ini, jenis elisitor yang digunakan adalah ekstrak ragi. Ekstrak ragi sering digunakan sebagai stimulant untuk meningkatkan produksi metabolit sekunder dari tanaman. Ekstrak ragi juga sering dimasukkan sebagai komponen dari media tumbuh, terutama sebagai sumber asam amino dan vitamin, khususnya inositol dan vitamin B₁ (Bonner dan Addicott, 1937). Ekstrak ragi telah terbukti meningkatkan produksi asam rosmarinat sampai 10 kali lipat pada kultur sel *Orthosiphon aristatus* yang dicapai 72-96 jam setelah penambahan (Sumaryono et. al., 1991). Elisitasi ekstrak ragi dilakukan setelah kultur mencapai umur dua minggu. Setelah satu dan dua minggu proses elisitasi, kultur selanjutnya dipanen. Setiap perlakuan dilakukan 3 kali pengulangan. Tiap sampel diekstraksi menggunakan pelarut etil asetat. Pelarut etil asetat dipilih karena mampu melarutkan xantORIZOL dengan sempurna.

Sebelum dilakukan analisis kadar xantORIZOL dari ekstrak dengan menggunakan KCKT, terlebih dahulu ditentukan kurva kalibrasi dari seri konsentrasi standar xantORIZOL. Detektor yang digunakan yaitu *diode array* dengan deteksi UV pada panjang gelombang 280 nm. Waktu retensi xantORIZOL pada kromatogram KCKT berada di sekitar menit ke empat (Gambar 4).



Gambar 4. Kromatogram KCKT xantORIZOL dengan waktu retensi 4,14 menit (dalam lingkaran)

Dari semua konsentrasi ekstrak ragi yang ditambahkan kedalam kultur, xantORIZOL hanya terdeteksi pada sampel yang diberi perlakuan elisitasi menggunakan ekstrak ragi 100 ppm pada panen minggu pertama. Sampel ekstrak ragi 100 ppm dapat menstimulasi produksi xantORIZOL sebesar 0,186%. Sebagai kontrol pembandingan digunakan simplisia temulawak (*wild type*). Hasil pengukuran sampel simplisia temulawak menunjukkan bahwa kandungan xantORIZOL dalam simplisia adalah 0,251%. Hasil tersebut menunjukkan bahwa jumlah xantORIZOL yang dihasilkan dari proses kultur jaringan lebih kecil 1,349 kali dibandingkan dengan sampel simplisia. Namun, jika dilihat dari efisiensi

penanaman, jumlah xantORIZOL yang didapat dengan teknik kultur jaringan masih lebih banyak karena dapat dipanen setiap bulan, sedangkan metode penanaman secara konvensional hanya dapat dipanen dalam jangka waktu 10-12 untuk mendapatkan hasil yang optimal. Disamping itu kandungan senyawa yang dihasilkan oleh suspensi sel lebih sederhana dibanding kandungan tanaman aslinya sehingga memudahkan dalam proses isolasi dan pemurnian xantORIZOL.

Beberapa studi sebelumnya menunjukkan bahwa ekstrak ragi dapat meningkatkan produksi asam sikimat, prekursor dalam jalur fenilpropanoid. Hasil ini bisa mengindikasikan bahwa ekstrak ragi juga terlibat dalam jalur biosintesis seskuiterpen (jalur mevalonat) dan menstimulasi produksi xantORIZOL.

Kesimpulan

Elisitasi kultur suspensi temulawak dengan zat elisitor ekstrak ragi sebesar 100 ppm dapat menstimulasi atau meningkatkan pembentukan metabolit sekunder (xantORIZOL) sebesar 0,186%.

Daftar Pustaka

- Anggakusuma, Y., M. Lee, J.K. and Hwang, 2009, Estrogenic Activity of Xanthorrhizol Isolated from *Curcuma xanthorrhiza* Roxb., **Biol. Pharm. Bull.**, **32**(11), 1892-1897
- Kim, S.H., Hong, K.O., Chung, W.Y., Hwang, J.K., and Park, K.K. 2004, Abrogation of Cisplatin-Induced Hepatotoxicity in Mice by Xanthorrhizol is Related to its Effect on the Regulation of Gene Transcription, **Toxicol. App. Pharmacol.**, **196**, 346-355
- Rukayadi, Y., Yong, D., and Hwang, J.K. 2006, In Vitro Anticandidal Activity of Xanthorrhizol Isolated from *Curcuma Xanthorrhiza* Roxb, **J. Antimicrob. Chemother.**, **57**, 1231-1234
- Hwang, J.K., Shim, J.S., and Pyun, Y.R. 2000, *Antibacterial Activity of Xanthorrhizol from Curcuma Xanthorrhiza Against Oral Pathogens*, **Fitoter.**, **71**, 321-323
- Street, H. E., 1973, *Plant Tissue and Cell Cultures*, Oxford, London: Blackwell Scientific Publications
- Broeckling, C. D., Huhman, D. V., Farag, M. A., Smith, J. T., and May, G. D., 2005, *Metabolic Profiling of Medicago Truncatula Cell Cultures Reveals the Effects of Biotic and Abiotic Elicitors on Metabolism*, **J Exp Bot**, **56**, 323-336
- Bonner, J., F. Addicott, 1937, *Cultivation in vitro of Excised Pea Roots*, Bot. Gaz. 99, 144-170