

APLIKASI PERKEMBANGAN TEKNIK IN VITRO DAN ANALISIS FLOW CYTOMETRY UNTUK MENINGKATKAN PENYEDIAAN SENYAWA METABOLIT SEKUNDER TANAMAN

Agus Muji Santoso

Universitas Nusantara PGRI Kediri

agusmujisantoso@gmail.com

ABSTRACT

Today's, higher population cause the human necessary not only at basic food but also at medical compounds has increased too (quality and quantity). The bad impact of modern therapy cause the society should look for the alternative therapy specifically using medical compounds from tropical plants as well as can be found in their environment. Providing medical compounds by tropical plant by conventional methods were inefficient, such as the limitation of reproduction ability plant (by vegetative or generative), were dependent to host plant (medical plant parasite), most of medical plants belonging to rare plant, and the fluctuation of concentration medical compounds will be crucial problem to fulfill their necessary. Based on previous study showed that the improvement of plant tissue culture technique included of the invention and growth plant substances application were able to solve the providing callus as source of medical compounds. However, the higher rate of variation genetic callus caused the variation of medical compounds profile. Biology molecular technology such as flow cytometric and RAPD have great potential to monitor of callus profile, for examples DNA profile or stage of callus cells. Finally, the providing of medical compounds can be filled not only by quality and quantity.

Key words: medical compounds, plant tissue culture, flow cytometric analyses, tropical plant.

PENDAHULUAN

Pola hidup yang tidak seimbang menyebabkan tingginya angka pertumbuhan kanker di dunia. Saat ini kanker merupakan salah satu penyebab kematian yang paling sering terjadi dan kasus penderita senantiasa bertambah (Mutschler, 1991). Sebagian obat-obatan yang digunakan obat kimia yang bekerja dengan system *cycle dependent drug* membunuh kanker secara selektif pada fase-fase pertumbuhannya, seperti tahap mitosis atau pada sintesis DNA (Robin dan Kumar, 1997). Namun, obat kimia ini belum dapat terjangkau oleh masyarakat luas yang termasuk ekonomi menengah ke bawah.

Alternatif metode terapi kanker yang telah dilakukan adalah radiasi dan kemoterapi. Namun, juga belum menghasilkan dampak yang diinginkan. Pada umumnya kemoterapi mempunyai efek samping (Sukardiman *et al.*, 1999) dan komplikasi berupa kerusakan-

kerusakan pada jaringan yang masih sehat, oleh karena itu mulai banyak dilakukan penelitian tentang bahan obat dari alam yang dapat berfungsi sebagai antikanker.

Tanaman merupakan salah satu kerajaan kehidupan yang terbesar beserta diversitasnya (Sumitro, 2010). Kekayaan yang terkandung di dalamnya tidak hanya terletak pada variasi morfologi dan anatomi. Lebih lanjut, fisiologi atau karakter biosintesis metabolismenya pun beragam. Hal ini menyebabkan tumbuhan juga memiliki keragaman dalam manfaatnya, salah satunya adalah produk metabolime sekunder yang dihasilkan. Melalui jalur tertentu, metabolit sekunder dihasilkan (Teiz dan Zeiger, 2002). Berlimpahnya diversitas bahan alam di wilayah tropis dan sub tropis, seperti Indonesia, termasuk tumbuhan endemik ternyata telah lama dikenal dan banyak dimanfaatkan oleh masyarakat lokal dalam etnomedisinal (Susiarti *et al.*, 2005).

Senyawa metabolit sekunder tanaman tropis dan sub tropis dan derivatnya banyak memiliki kegunaan. Singh *et al.* (2010) melaporkan verbakosida pada *Harpagophytum procumbens* memiliki kasiat sebagai anti leukimia dan agen sitotoksin, anti inflamasi, menghambat aktivitas complemen serum manusia, serta derivatnya mampu sebagai anti oksidan yang baik. *Spilates acmella*, Murr., (Asteraceae) dapat dimanfaatkan sebagai bahan obat anti bakteri, anti inflamasi, bahan anti jamur, obat sakit perut, sakit gigi, dan isektisida alami karena mengandung skopoletin (Singh, 2010). *Sylbum marianum* dilaporkan juga dapat menghambat hepatitis dan sirosis serta memproteksi dari zat racun (Cacho, Dominguez, Rosselo, 2010). Di samping itu, tanaman tropis lainnya adalah *Maesa sp* (Myrcenaceae) yang memiliki senyawa saponin dengan berbagai kasiat (Faizal *et al.*, 2011). Korsangruang *et al.* (2010) juga melaporkan tanaman lokal *Pueraria candollei* (Fabaceae) baik varietas candoli maupun mirifica berpotensi sebagai bahan obat dan kosmetik kecantikan. *Pinnela ternata* (Araceae) juga telah teridentifikasi aktivitasnya sebagai anti *vomiting* (muntah), anti inflamasi, dan sebagai agen penginduksi aborsi di awal kehamilan (Liu *et al.*, 2010) dan kelompok *Spilates acmella*, Murr., diketahui dapat dimanfaatkan sebagai bahan obat dan isektisida alami (Singh, 2010).

Namun, penyediaan senyawa metabolit sekunder tersebut masih terkendala beberapa hal, misal jumlah tanaman yang terdapat di alam masih terbatas, akibat kemampuan untuk berkembangbiak baik secara vegetatif maupun generatif masih rendah (Singh *et al.*, 2010) serta masih tergantung pada iklim (Pati *et al.*, 2006; Dobraszki dan da Silva, 2010 dalam Singh *et al.*, 2010). Perbanyak tanaman dengan biji yang selalu menghasilkan indukan baru yang beragam juga belum dapat digunakan sebagai bahan penyedia fitofarmaka (Reddy *et al.*, 2004 dalam Singh, 2010). Pada umumnya, tanaman target termasuk tanaman yang populasinya terbatas (langka) (Jain *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2010) dan adanya eksplorasi tanaman lokal yang berlebihan seperti *Withania coagulans* (Jain *et al.*, 2004 dalam Singh, 2010), adanya fluktuasi metabolit sekunder tanaman di alam juga sulit dihindari (Plass, Eijkelboom, Hangerdorn, 1995) menyebabkan ekplorasi senyawa metabolit sekunder dari bahan segar secara masal sulit dilakukan. Terlebih tanaman-tanaman endemik yang

digunakan oleh masyarakat lokal masih banyak yang belum diketahui jenis dan pola aktivitas senyawa metabolit sekundernya (Susiarti, *et al.*, 2005; Susmandari, 2002; Sukardiman *et al.*, 1999).

Kemajuan dibidang teknik kultur jaringan tanaman mulai pengembangan teknik sterilisasi sampai ditemukaannya zat tumbuh sintetis seperti BA, NAA, Kinetin, IBA, BAP, pikloram, dicamba, thidaizuron (TDZ) memiliki potensi untuk terus dikembangkan aplikasinya dalam menyediakan kalus tanaman lokal penghasil senyawa metabolit sekunder (fitofarmaka). Modifikasi jenis dan konsentrasi karbon (Singh *et al.*, 2010); modifikasi jenis, kombinasi, dan konsentrasi zat tumbuh (Jain *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2010); jenis sumber eksplan (Liu *et al.*, 2010); serta penggunaan elisor baik biotik maupun abiotik, misal oleh Korsangruang *et al.* (2010) juga terus dilakukan sebagai upaya untuk meningkatkan penyediaan kalus penyedia metabolit sekunder. Dengan teknik kultur jaringan, efektivitas waktu, tenaga, biaya (Stancheva *et al.*, 2011; Faizal *et al.*, 2011), dan pengambilan bagian tanaman dari habitat asli (agar tidak *over exploitation*) dapat ditekan. Dengan pendekatan kultur jaringan, penyediaan metabolit sekunder dapat dioptimalkan (Stancheva *et al.*, 2011). Namun demikian, kalus yang dihasilkan belum tentu mengandung sel-sel yang umurnya sama (Cacho *et al.*, 2010 dan Stancheva *et al.*, 2010), kandungan DNA dan siklus setiap sel-sel kalus (Haas *et al.*, 2008 dan Yanpaisan *et al.*, 1998, 1999 dalam Stancheva *et al.*, 2010). Adanya variasi pada sel-sel kalus, memiliki potensi adanya perbedaan metabolisme sel. Berdasarkan deskripsi kondisi empiris tersebut, sinergi antara teknik kultur jaringan tanaman dengan teknik identifikasi sel-sel kalus, baik dalam bentuk DNA atau tahapan sel yang sedang terjadi dalam waktu inisiasi kalus, sangat menarik dijadikan sebagai pertimbangan pada salah satu tahapan dalam penyediaan senyawa metabolit sekunder baik dari segi kuantitas maupun kualitas, dalam skala laboratorium maupun skala industri.

PEMBAHASAN

Teknik kultur jaringan tanaman merupakan cara untuk memperoleh *clon* (individu baru) dengan prinsip-prinsip tertentu (Hendaryono dan Wijayani, 1994). Diantaranya adalah prinsip steril dari hama dan penggunaan sebageian tubuh (jaringan) tanaman (yang bersifat meristematis). Dengan demikian, peluang perbanyakan (propagasi) tanaman lokal dan endemik serta yang memiliki keterbatasan dalam perkembangbiakan secara alami (baik vegetatif maupun generatif) cukup besar dilakukan. Terlebih tanaman lokal yang selama ini digunakan oleh masyarakat untuk memenuhi kebutuhan di bidang pangan dan medis atau pengobatan (etnomedisinal) (Susiarti, *et al.*, 2005).

Di samping itu, perkembangan teknik kultur jaringan tanaman juga tidak hanya di aspek teknik propagasi saja, namun juga pada teknik memodifikasi media (kultur padat dan cair) baik dalam aspek optimasi jenis dan konsentrasi sumber karbon (gula) (Hendaryono dan Wijayani, 1994) maupun penggunaan jenis, kombinasi dan konsentrasi zat tumbuh baik dari kelompok auksin maupun sitokinin. Dengan diidentifikasinya struktur fitohormon (hormon

endogen), dengan perkembangan kimia organik dan kimia bahan alam, dewasa ini banyak dihasilkan berbagai hormon sintetis (zat tumbuh), mulai dari golongan auksin sampai sitokinin. Perkembangan tersebut juga seiring dengan perkembangan teknik isolasi dan fusi protoplas, induksi organ (organogenesis), induksi embrio (embriogenesis), kultur embrio, kultur anthera, teknik subkultur cair maupun padat, sampai teknik transformasi pada perakitan tanaman transgenik. Perkembangan tersebut juga tidak lepas dari teknologi fisika optik, fisika fisik, fisika mekanika.

Optimasi jenis sumber karbon untuk meningkatkan penyediaan kalus telah dilakukan. Diantaranya oleh Singh *et al.* (2010) dalam optimasi penyediaan kalus *Spilanthes acnella*, Merr digunakan sumber karbon berupa glukosa, maltosa, sukrosa. Diperoleh hasil bahwa sukrosa dapat menginduksi panjang pucuk dengan taraf signifikasn 5% dan jumlah pucuk dalam embriogenesis pada konsentrasi 50 gram/ L pada ½ Murashige and Shoog (MS) yang dapat menginduksi akar sampai 100%. Hal ini didasarkan bahwa sukrosa merupakan disakarida yang memiliki struktur pereduksi yang lebih sederhana dari pada glukosa (monosakarida) dan maltosa (disakarida) (Jeremy *et al.*, 2002; Alromaihi dan Elmerr, 2009). Hal senada juga dilakukan oleh Alromaihi and Elmerr (2009) dalam penyediaan embrio melalui kalus *Phoenix dactifolia* untuk metabolit sekunder anti inflamasi dan optimasi kalus *Papaver somniferus* oleh Oluk (2006) untuk mempenyediaan papaverin, codein, thebaine, noscapine, dan morphine.

Di sisi lain untuk meningkatkan penyediaan kalus sebagai penyedia metabolit sekunder juga dilakukan optimasi penggunaan zat tumbuh auksin dan sitokinin. Dalam hal ini dapat berupa optimasi jenis sekaligus kombinasi dan konsentrasi auksin dengan sitokinin. Seperti yang dilakukan oleh Jain *et al.* (2011) dengan menggunakan BA (6-benzyladenin), IBA (indole-3-butyric acid), IAA (indole-3-acetic acid), Kn (kinetin), NAA (α -naphthaleneacetic acid), dan PAA (phenylacetic acid). Namun, yang optimal dalam organogenesis pucuk (tunas) *Withania coagulans* dari fase kalus (indirect) adalah jenis auksin BA dan Kn pada konsentrasi 22,2: 2,3 μ M dengan respon 80% dan rataan tunas 17,6 pada taraf signifikan 5%. Adapun kombinasi antara IAA, NAA, PAA, dan BA (data tidak disajikan) hanya membentuk kalus dengan struktur kompak, kecoklatan, tapi kombinasi tersebut tidak dapat menginduksi organogenesis.

Di sisi lain studi aplikasi penambahan BA dan NAA secara tunggal maupun kombinasi untuk mengiduksi tunas aksial pada *Maesa spp* (untuk penyediaan saponin) menunjukkan hasil berbeda. Jika dibandingkan, aplikasi secara tunggal BA (tanpa NAA) pada *M.argentea* (13,2 μ M); *M.lanceolata* (13,2 μ M); dan *M.balancae* (8,8 μ M). Adapun secara kombinasi, BA dan NAA pada konsentrasi 22,2: 5 μ M juga mampu memberikan hasil terbaik. Hasil tersebut (kombinasi BA dan NAA) pada *M.perlarius* juga dapat diperoleh dengan aplikasi BA secara tunggal pada konsentrasi 13,2 μ M yang secara uji statistik hasil yang diperoleh tidak berbeda signifikan. Tetapi, jika BA atau NAA dikombinasikan dengan TDZ diperoleh hasil berbeda. Penginduksian tunas pucuk beberapa *Maesa spp* dapat optimal jika TDZ dikombinasikan

dengan NAA, misal *M.manceolata* pada perbandingan 22,7: 1,35 μ M. Sedangkan akar akan terbentuk pada konsentrasi BA dan NAA yang sama tinggi, misal pada konsentrasi 22,2:2 μ M di *M.balancae* (data tidak disajikan)(Faizal *et al.*, 2011).

Penelitian yang dilakukan oleh Liu *et al.* (2010) menunjukkan bahwa sumber jenis eksplan yang berasal dari umbi dan daun yang disertai tangkainya (*petiole*) pada *Pinellia ternata* memiliki respon yang berbeda dalam pembentukan *protocorm-like bodies* (PLB). PLB akan terbentuk dengan cepat dari eksplan umbi *P.ternata* pada media MS standar dengan penambahan NAA dan BA (gambar 1) dengan perbandingan 0,2 : 2 mg/L, dan pada 1,0: 2,0 mg/L. Sedangkan eksplan berupa daun yang disertai tangkainya pada konsentrasi 0,2:2,0 mg/L baru akan membentuk PLB (yang selanjutnya akan cenderung berdiferensiasi). Studi serupa juga dilaporkan oleh Jain *et al.* (2011) bahwa adanya tangkai daun (*petiole*) dapat menginduksi organogenesis lebih cepat (gambar 2) jika dibandingkan dengan eksplan daun tanpa *petiole* pada *Withania coagulans* (data tidak disajikan). Hal tersebut didukung dari studi sebelumnya bahwa pada *petiole* dapat meningkatkan regenerasi pucuk pada beberapa jenis tanaman, seperti *Paulownia tomentosa* (Corredoria *et al.*, 2008), *Prunus persica* (Gentile *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2010), dan *P.serotina* (Liu dan Pijut, 2008). Ini cukup kontradiktif dengan pembentukan tunas adventif pada *Maesa spp.* untuk kepentingan penyediaan saponin dilaporkan telah berhasil dilakukan dengan menggunakan daun tanpa mengikutsertakan *petiole* (Faizal *et al.*, 2011). Pengaruh posisi eksplan yang ditanam dan posisi potongan eksplan terhadap media juga dikaji oleh Germana *et al.* (2010) untuk organogenesis pada epikotil *Citrus sinensis* (gambar 3). Dinyatakan bahwa posisi peletakan eksplan, permukaan bekas potongan eksplan terhadap media, dan penambahan sitokinin pada segmen epikotil *Carrizo citrange* setelah dua minggu kultur memiliki perbedaan antar perlakuan yang signifikan.

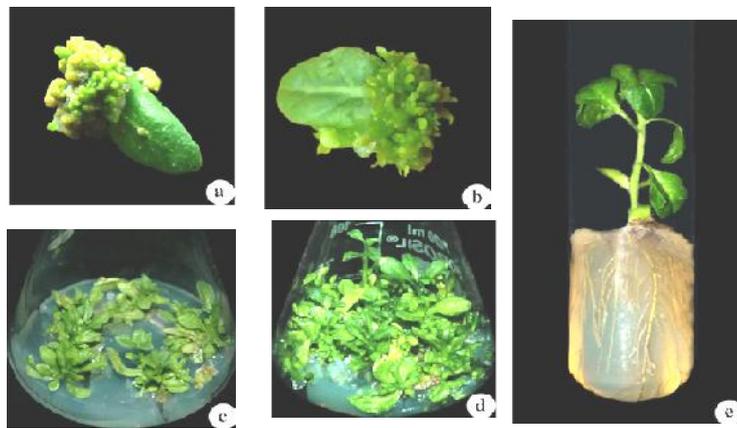
Dengan demikian, selain aplikasi zat tumbuh, optimasi penyediaan kalus penyedia metabolit sekunder juga dapat dilakukan dengan mengoptimasi jenis sumber eksplan. Namun, oleh karena jenis tanaman tropis lokal penghasil metabolit sekunder sangat beragam (dengan karakteristik yang beragam pula), maka eksplorasi awal untuk optimasi jenis sumber eksplan, jenis dan konsentrasi sumber karbon, dan jenis beserta kombinasi serta konsentrasi zat tumbuh, termasuk pemilihan peletakan posisi eksplan dan posisi bekas potongan eksplan terhadap media sangat diperlukan dan menarik ditelaah lebih lanjut sebagai salah satu bentuk pengembangan teknik kultur jaringan tanaman.

Setelah diperoleh kalus dari tanaman target (sumber eksplan) penghasil metabolit sekunder, dapat dilanjutkan dengan tahap memperbanyak kalus. Teknik yang telah dikembangkan adalah dengan sub kultur kalus pada media yang sesuai. Dilaporkan oleh Liu *et al.* (2010) dalam penyediaan PLB dari *Pinellia ternata* bahwa diperlukan sub kultur untuk meningkatkan penyediaan kalus dalam jumlah tertentu dalam media dengan komposisi sama. Pada umumnya bentuk media yang semula padat diganti media cair, dengan cara tidak menambahkan agar (pemadat) dan meletakkan dalam *inkubating shaker* pada kecepatan

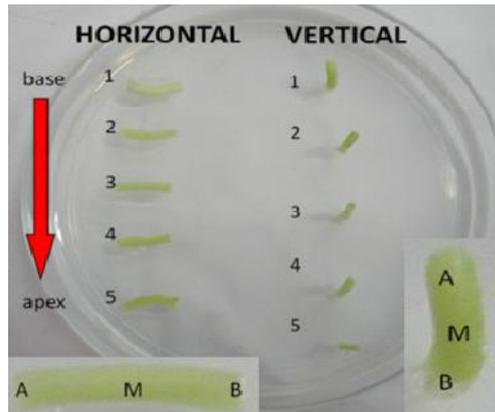
tertentu (Hendaryono dan Wijayani, 1994). Tujuannya agar kalus mendapat aerasi cukup dan kontak media dengan kalus diharapkan lebih besar, sehingga dapat memacu pembelahan dan pemanjangan sel lebih lanjut, sehingga diperoleh produksi kalus yang diinginkan.



Gambar 1. (a) PLB yang diinduksi dari umbi. (b) PLB yang diperoleh dari eksplan daun berserta petiole. (c) setelah satu tahun umbi dapat dipanen (Liu *et al.*, 2010).



Gambar 2. Induksi kuncup tunas dari eksplan daun *W.coagulans*. (a). Induksi tidak langsung pada media MS 13,3 μM BA dan 2,3 μM Kn. (b) induksi langsung dari petiole pada media MS 22,2 μM BA dan 2,3 μM Kn. (c) perkembangan kuncup tunas pada tahap pertama pada media pembelahan (proliferasi). (d) pembelahan dan pemanjangan tunas pada media MS 2,2 μM Ba; 2,3 μM Kn; dan 3,9 μM PG. (e) pembentukan akar pada media $\frac{1}{2}$ MS 1,2 μM IBA; 3,6 μM PAA, dan 14,3 CC (Jain *et al.*, 2011).



Gambar 3. Posisi kalus yang diletakkan pada media agar. A=apikal, B=basal, dan M=tengah (Germana *et al.*, 2011).

Pada aplikasinya, kultur jaringan tanaman tidak hanya membentuk kalus saja. Namun, organogenesis dan embriogenesis dapat dilakukan baik dalam satu jalur (Oktavia *et al.*, 2003) maupun dalam jalur terpisah (Sukmadjaja, 2005). Pembentukan kalus yang diikuti dengan pembentukan embrio (embriosomatik tidak langsung) memiliki keuntungan (Kasi dan Sumaryono, 2006; Sukmadjaja, 2005), berupa beragamnya sifat genetik yang dimiliki oleh embrio (Biswas *et al.*, 2009; Sukmadjaja, 2005). Tidak hanya embriosomatik saja, peluang terjadinya variasi genetik juga dapat terjadi pada organogenesis dalam satu kalus. Keragaman ini sangat bermanfaat untuk propagasi tanaman yang bertujuan untuk mencari peningkatan biodiversitas suatu genus atau spesies tanaman budidaya atau tanaman endemik yang memiliki kemampuan berkembangbiak relatif rendah. Harapannya, selain terkonservasi tanaman yang dikendaki juga dapat digunakan sebagai produk bioekonomi, seperti pada bunga lilin Australia (*Chamelaicum sp.*) (Ratasanabon and Seaton, 2010).

Di sisi lain, pada jalur metabolit sekunder, senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan akan tercurah pada vakuola (Teiz and Zeiger, 2002) bersama dengan beberapa senyawa yang tidak dapat dikeluarkan secara langsung dari sel tanaman (Edwards and Gatehouse, 1999), seperti kristal kalsium oksalat (Fahn, 1990) serta beberapa glukosida dan derivat glukosa tertentu (Teiz and Zeiger, 2002; Fahn, 1990). Dengan demikian, selain dipengaruhi oleh faktor metabolisme primer (utama) berupa jalur oksidasi glukosa (Jeremy *et al.*, 2002), juga dipengaruhi oleh umur sel. Perkembangan vakuola akan sebanding dengan perkembangan sel tanaman (Fahn, 1990). Dengan demikian, semakin terdeferensiasi suatu sel, maka semakin kompleks massa yang terdapat di dalam vakuola.

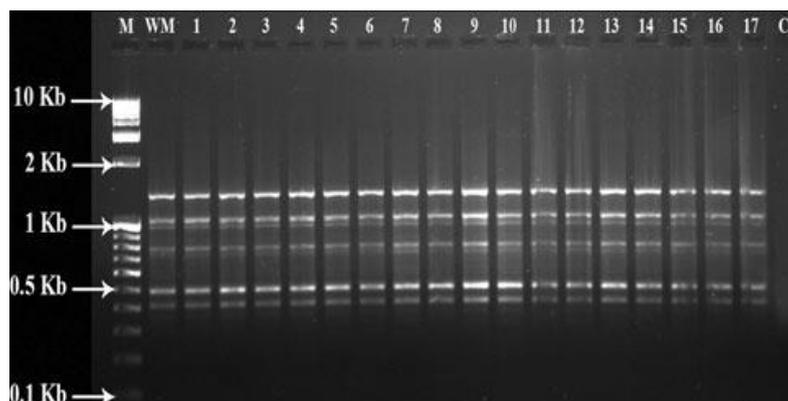
Berdasarkan deskripsi tersebut, kalus yang telah diinduksi menjadi organ atau menjadi embrio, memiliki fase *start* untuk membelah yang berbeda-beda dalam satu eksplan.

Akibatnya, pembentukan organ-organ atau multiembriosomatik pada satu kalus menjadi beragam. Larkin dan Scowcroft (1981) dalam Pardo *et al* (2010) menjelaskan bahwa dalam propagasi tanaman, aspek krusial yang sering terjadi adalah adanya retensi genetik, dimana teknik kultur *in vitro* mampu menginduksi terjadinya variasi anakan (*clon*) disebut variasi somaklonal.

Dengan demikian, adanya potensi variasi sifat pada sel-sel kalus penyedia metabolit sekunder memiliki peluang untuk mempengaruhi metabolit sekunder yang dihasilkan. Analisis *Random Amplification of Polymorphic DNA* (RAPD) juga dapat digunakan untuk analisis keanekaragaman genetik suatu spesies sekaligus dapat untuk mengetahui kekerabatan antar spesies (Biswas *et al.*, 2009). Teknik RAPD ini menggunakan teknik dasar *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan menggunakan primer tertentu dan analisis profil pita DNA dengan elektroforesis gel aragosa beserta marker (Biswas *et al.*, 2009).

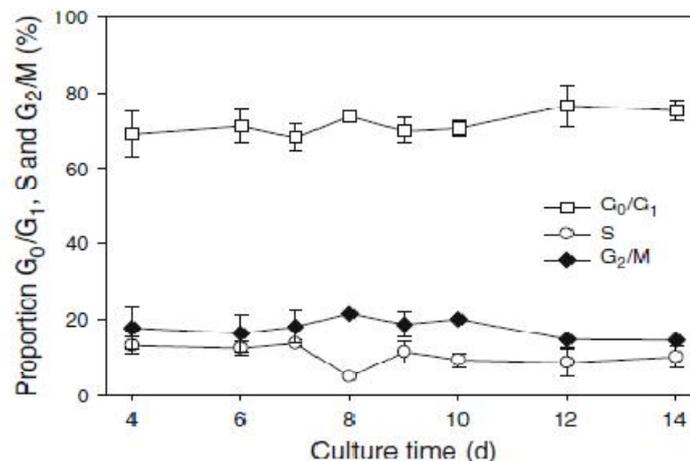
Aplikasi teknik RAPD ini telah berhasil dilakukan oleh Jian *et al.* (2011) untuk mengetahui sifat *clon* yang diperoleh untuk menghasilkan senyawa withanolida. Penelitian tersebut menggunakan sampel daun planled dan daun dari tanaman induk (sumber eksplan) sebagai pembanding. Diperoleh data bahwa bahwa profil DNA (band) plantled *Withania coagulans* sama seperti induk dan antar plantled sendiri tidak ada variasi DNA (gambar 4). DNA dengan berat molekul 0,5 Kb dan 1 Kb terdeteksi pada seluruh *clon* yang diujikan, kecuali pada kontrol (C). Disamping itu, muncul DNA dengan berat molekul antara 1,5 Kb sampai dengan 2 Kb yang terdapat pada semua *clon* namun tidak pada kontrol. DNA tersebut (yang muncul antara 1-2 Kb) dapat diasumsikan sebagai DNA yang berperan dalam proses pertumbuhan, kemungkinan yang terlibat langsung dalam proses awal pembentukan kalus atau organogenesis bahkan embriogenesis. Hal ini dapat menandakan bahwa *clon* dapat digunakan sebagai penyedia senyawa withanolida.

Upaya untuk mengidentifikasi variasi genetik yang terjadi pada kalus yang telah diperoleh juga dapat dilakukan dengan menggunakan teknologi *flow cytometry* (Faizal *et al*, 2011; Stancheva *et al*, 2011; Prado *et al*, 2010; dan Cacho *et al*, 2010). Aplikasi *flow cytometry* yang dilakukan oleh Faizal *et al* (2011) bertujuan untuk mengetahui ploidi pada tunas beberapa *Maesa* spp. yang mengalami regenerasi. Hasilnya menunjukkan bahwa seluruh sampel yang diujikan memiliki karakter puncak yang sama. Dengan demikian menandakan bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan sifat ploidi *clon* yang dihasilkan.



Gambar 4. Elektroforesis fragmen RAPD gel aragosa menunjukkan pola band (pita) yang diamplifikasi dengan primer OPF-3. M=marker, C=kontrol (Jian *et al.*, 2011)

Walaupun bertujuan untuk mengetahui sifat genetik *clon* yang dihasilkan, ternyata aplikasi *flow cytometry* yang dilakukan oleh Stancheva *et al* (2011) berbeda, yaitu menggunakan aspek pengamatan yang digunakan berupa analisis siklus sel yang terjadi pada sel-sel *clon* yang dihasilkan. Diperoleh hasil bahwa pada hari ke 4 sampai ke 7 fase sel yang berada di G₀/G₁, S, G₂/M relatif stabil. Namun, pada hari ke 8, terjadi peningkatan persentase sel yang berada pada G₀/G₁ dan G₂/M, sedangkan S mengalami penurunan. Pada hari ke 9 sampai dengan ke 14 persentase sel yang berada pada tahap G₂/M dan S cenderung stabil, namun pada fase G₀/G₁ cenderung meningkat (gambar 6).



Gambar 6. Persentase sel *Harpagophytum procumbens* yang mengalami tahap G₀/g₁, S, dan G₂/M mulai hari ke 4 sampai dengan 14 kultur (Stancheva *et al*, 2011).

Teknik ini juga digunakan oleh Chaco *et al.* (2010) untuk mengevaluasi persentase sel yang berada pada tahap G₀/G₁ dan S+G₂/M selama hari pertama sampai 72 hari kultur suspensi sel *Sylibum marianum*. Namun, ada perbedaan dengan yang dilakukan oleh Stancheva *et al.* (2011), yaitu terletak pada pengelompokan jenis pembelahan sel saja. Chaco *et al.* (2010) menyederhanakan pengelompokan pembelahan sel S dengan menggabungkan dengan tahap G₂/M. Tahap G₀/G₁ yang dimulai pada hari pertama sampai hari ke 24 mengalami penurunan, namun cenderung naik kembali sampai hari 72. Hal ini berbeda dengan tahap S+G₂/M yang cenderung fluktuasi. Berdasarkan gambar 6, maka karakteristik sel-sel kalus *Harpagophytum procumbens* cenderung seragam, namun

berdasarkan pada penelitian lainnya seperti karakteristik sel-sel kalus *Sylibum marianum* cenderung heterogen.

Adanya informasi berupa karakteristik sel-sel kalus yang dihasilkan selama kultur dan subkultur menunjukkan bahwa informasi kerakteristik sel-sel kalus yang dihasilkan sangat relevan untuk dijasikan sebagai bahan pertimbangan dalam produksi kalus sebagai penyedia metabolit sekunder.

Pengukuran kuantitatif senyawa target dapat dilakukan dengan menggunakan menggunakan teknik HPLC (*high performance liquid chromatography*) (Chaco *et al.*, 2011; Stancheva *et al.*, 2011; Jain *et al.*, 2011; Korsangruang *et al.*, 2010; Sigh *et al.*, 2010), UV Spektromotometri (Liu *et al.*, 2010), dan secara kuantitatif dengan kromatografi Kertas Lapis Tipis (KLT) (Faizal *et al.*, 2011; Jain *et al.*, 2011).

SIMPULAN

Perkembangan teknik kultur jaringan tanaman memiliki potensi untuk meningkatkan penyediaan kalus tanaman lokal tropik terutama yang memiliki hambatan dalam penyediaan senyawa metabolit sekunder. Aplikasinya dapat dengan memodifikasi media berupa jenis sumber karbon, zat tumbuh, strategi penanam (posisi eksplan) pada media, sampai teknik elisitasi. Namun, adanya variasi genetik yang sering dimiliki oleh sel-sel kalus (baik dengan jalan pembentukan kalus saja, maupun melalui tahap organogenesis dan embriogenesis) menyebabkan belum optimalnya penyediaan senyawa metabolit sekunder dalam skala besar. Dengan demikian, sinergi teknik kultur jaringan tanaman dengan teknologi analisis variasi genetik baik dengan RAPD maupun dengan *flow cytometry* diharapkan mampu meningkatkan penyediaan metabolit sekunder tanaman lokal tropik secara kuantitas, namun juga secara kualitas.

DAFTAR PUSTAKA

- Faizal, A. 2011. In Vitro propagation of Four saponin producing Maesa species. *Plant Tissue Organ Culture Journal*. 105.
- Jain, R. 2011. Adventitious Shoot Regeneration and In Vitro Biosynthesis of Steroidal Lactones in *Withania coagulans* (Stock) Dunal. *Plant Tissue Organ Culture Journal*. 105, p135-140.
- Liu, Y., Liang, Z., dan Liu, J. 2010. Use of protocorm-Like-Bodies for Studying Alkaloid Metabolism in *Pinellia ternata*. *Plant Tissue Organ Culture Journal*. 100, p.83-89.
- Korsangruang, S. 2010. Effects of Biotic and Abiotic Elicitors on Growth and Isoflavonoid Accumulation in *Pueraria candollei* var. *candollei* and *P. candollei* var. *mirifica* Cell Suspension Cultures. *Plant Tissue Organ Culture Journal*. 103, p.333-342.
- Singh, M., dan Chaturvedhi, R. 2010. Improved Global Propagation of *Spilotes acmella*, Murr. for Production of Scopoletin. *Plant Tissue Organ Culture Journal*. 103, p.234-253.
- Stancheva, N. 2011. Phytochemical and Flow Cytometric Analyses of Devil's Claw Cell Cultures. *Plant Tissue Organ Culture Journal*. 105, p.79-84.
- Sood, Hemant., dan R.S. Chauhan. 2010. Biosynthesis and Accumulation of a Medical Compound, Picrosida I, in Cultures of *Picrorhiza kurroa* Royle ex Benth. *Plant Tissue Organ Culture Journal*. 100, p.113-117.
- Fahn, A. 1990. *Plant Anatomy*. England: Pergamon Press plc.
- Hendaryono dan Wijayani. 1994. *Teknik Kultur Jaringan Tumbuhan*. Yogyakarta: Canisius.
- Mutschler, E. 1991. *Dinamika Obat*, Edisi 5. Diterjemahkan Oleh Mathilda, B, Widiyanto dan Ana Setiadi Ranti. Penerbit ITB: Bandung. 700-770.
- Teiz and Zeiger. 2002. *Plant Physiology*. Sunderland: Sinauer Publishing.
- Sukardiman. 1999. Efek Anti Kanker Isolat Flavonoid dari Herba benalu Mangga (*Dendrophoe petandra*). *Jurnal Cermin Dunia Kedokteran*. 122, hal. 5-8.