

INDUKSI SINTESA KURKUMINOID DALAM KALUS TEMULAWAK (*Curcuma xanthorrhiza*, Roxb) AKIBAT PENGARUH HORMON 2,4-D DAN FENILALANIN PADA MEDIA KULTUR

Induction of curcuminoid synthesis in Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*, Roxb) Callus Effected by 2,4-D Hormone and fenilalanine in Media culture

Yudi Rinanto¹

Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi¹

Abstrak

Penambahan prekursor ke dalam media *Murashige Skoog* (MS) secara *in vitro* diharapkan dapat meningkatkan sintesa kurkuminoid dalam kalus. Fenilalanin merupakan prekursor dalam sintesa kurkuminoid. Hormon 2,4-D juga ditambahkan kedalam media tumbuh untuk menginduksi pembentukan kalus. Konsentrasi hormon 2,4-D dan Fenilalanin masing-masing sebanyak 0 ppm, 2 ppm dan 4 ppm.

Uji kualitatif kurkuminoid dilakukan dengan reaksi warna dan KLT (khromatografi lapis tipis), dilanjutkan uji kuantitatif menggunakan silika GF₂₅₄ sebagai fase diam, dan kloroform : etanol 965 : asam acetat glasial (94:5:1) sebagai fase gerak. bercak dianalisa dengan KLT densitometer dan luas area bercak dimasukkan dalam persamaan kurva baku kurkuminoid. Hasil pengamatan menunjukkan waktu induksi kalus tercepat dihasilkan oleh pemberian hormon 2,4-D sebanyak 4 ppm. Kadar kurkuminoid rimpang lebih besar dari pada kadar kurkuminoid dalam kalus. Kombinasi hormon 2,4-D dan Fenilalanin menghasilkan kadar kurkumin lebih banyak dibanding kadar desmetoksi-kurkumin untuk setiap kombinasi perlakuan yang sama. Kadar kurkumin terbanyak dihasilkan oleh kombinasi hormon 2,4-D dan Fenilalanin dengan konsentrasi masing-masing 4 ppm sebesar 0,39%. Sedangkan kadar desmetoksi-kurkumin terbanyak dihasilkan oleh kombinasi hormon 2,4-D dan Fenilalanin berturut-turut dengan konsentrasi 4 ppm dan 2 ppm sebesar 0,1865 %. Pemberian hormon 2,4-D bersama-sama dengan fenilalanin kedalam media tumbuh lebih banyak berpengaruh terhadap sintesa kurkumin dibanding desmetoksi-kurkumin.

Kata kunci : kurkuminoid, temulawak, 2,4-D, fenilalanin

1).Tenaga pengajar Kopertis Wilayah VII, dpk STIPER Jember

ABSTRACT

The addition of precursor into in vitro Murashige Skoog (MS) media culture expected to be able improve curcuminoid synthesis within the callus. Phenylalanine is precursor in curcuminoid synthesis. 2,4-D hormone is also added into media culture to induce callus formation. The concentration of 2,4-D hormone and phenylalanine is 0, 2 and 4 ppm, respectively.

The qualitative analysis was done with color reaction and Thin Layer Chromatography (TLC) with gel silicon GF₂₅₄ as stationary phase and chloroform : ethanol 96%: glacial acetic acid (94:5:1) as movement phase and detected by the visible ligh. The quantitative analysis was done by measuring the spot area in the TLC chromatogram with TLC scanner, and then was calculated using standart curcumin curve. Base on the experiment indicates 2,4-D Hormone with 4 ppm result the fastest time callus induction. Curcuminoid content is higher in rhizome compared in callus. The combination of 2,4-D hormone and phenylalanine yield the higher curcumin content than desmetoxi-curcumin for each treatment combination. The highest curcumin content is produced by 2,4-D hormone and phenylalanine combination with 4 ppm concentration that is 0,39 %. Meanwhile the highest desmetoxi-curcumin is produced by 2,4-D hormone and phenylalanine combination with 4 and 2 ppm concentration, respectively, that is 0,18 %. 2,4-D hormone and phenylalanine affects more significantly in curcumin synthesis rather than desmetoxi-curcumin.

Keywords: curcuminoid, *Curcuma xanthoriza* Roxb, 2,4-D hormone, phenylalanin.

1).Lecturer of STIPER Jember

1. PENDAHULUAN

Salah satu jenis tanaman obat yang potensial untuk dikembangkan adalah temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*, Roxb). Temulawak secara historis mempunyai kegunaan tradisional yang cukup luas dikalangan masyarakat Indonesia, oleh karenanya banyak kalangan yang mempromosikan temulawak sebagai tanaman obat khas Indonesia (Rukmana, 1995).

Kurkumin termasuk salah satu senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam tanaman temulawak. Prekursor yang berperan di dalam biosintesis kurkumin adalah senyawa fenilalanin, asam asetat dan malonat. Terdapat berbagai pendapat mengenai pembentukan kurkumin, salah satu pendapat mengatakan bahwa biosintesis melibatkan dua unit cinnamat yang digabungkan dengan suatu atom karbon pusat yang mengandung malonat.

2,4-D merupakan golongan *auxin* sintetik yang mempunyai sifat stabil oleh pemanasan dan berpengaruh terhadap perkembangan sel dengan meningkatkan tekanan osmotik, sintesa protein, permeabilitas sel terhadap air, dan melunakan dinding sel sehingga air dapat masuk ke dalam sel yang disertai dengan kenaikan volume sel. Meningkatkan sintesa protein dapat digunakan sumber tenaga dalam pertumbuhan (Hendaryono dan Wijayani, 1994). Pada konsentrasi tinggi digunakan sebagai herbisida, sehingga dalam kultur *in vitro* digunakan dalam konsentrasi rendah (Gunawan, 1995; Yusnita, 2003).

Penelitian dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian prekursor fenilalanin kedalam media tumbuh yang dikombinasikan dengan hormon 2,4-D terhadap sintesa kurkuminoid dalam kalus temulawak. Jika cara ini berhasil maka diharapkan dapat mempercepat dalam memperoleh kurkuminoid karena isolasi terhadap kelompok senyawa tersebut dapat dilakukan menggunakan kalus, sehingga

tidak perlu harus menunggu waktu sampai tanaman temulawak mencapai umur produktif.

2. METODE PENELITIAN

Bahan

Media *Murashige Skoog* (MS), hormon 2,4-D, fenilalanin, tunas muda temulawak sebagai eksplan. Bahan kimia untuk sterilisasi adalah Dithane 430-F, bayclin®, alkohol 70 dan tween 80. Bahan kimia untuk analisis kurkumin secara KLT adalah kurkumin standart, metanol, plat silica gel GF₂₅₄, kloroform, etanol, asam asetat glacial, hexane, etil asetat, kloroform, larutan NaOH 5%, asam sulfat pekat dan alkohol 95%.

Alat

Autoklaf, oven, alat-alat gelas, *Laminar Air Flow* (LAF), Timbangan analitik, pH stick, bejana pengembang, iluminator UV dan TLC Scanner CS – 930.

Pengamatan

Beberapa parameter yang diamati dalam penelitian ini meliputi :

1. Waktu eksplan membentuk kalus, diamati mulai eksplan menunjukkan perubahan bentuk dengan adanya benjolan-benjolan massa sel yang dapat diamati secara visual.
2. Penentuan prosentase keberhasilan dilakukan dengan membandingkan jumlah eksplan yang berhasil membentuk kalus dengan jumlah seluruh eksplan yang ditanam, kemudian dikalikan 100%.
3. Penentuan prosentase ketentuan kontaminasi dilakukan dengan membandingkan jumlah eksplan yang terkontaminasi dengan jumlah eksplan yang ditanam kemudian dikalikan 100%. Kontaminasi dinilai dengan mengamati eksplan atau medium yang ditumbuhi koloni jamur atau bakteri yang dapat diamati secara visual.
4. Analisis kurkuminoid dengan reaksi warna. Uji pendahuluan dengan reaksi warna dilakukan dengan larutan NaOH 5% dan pereaksi asam sulfat pekat :

alkohol 95% (1:1). Adanya kurkumin ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah jingga jika ditambah pereaksi asam sulfat pekat : alkohol 95% (1:1).

- Analisis kurkuminoid secara KLT. Lempong yang digunakan alumunium silika GF₂₅₄ sebagai fase diam. Ekstrak metanol dari rimpang, tunas dan kalus sebanyak 4 µl ditotolkan pada lempeng dalam larutan pengembang khloroform : etanol : asam asetat glasial (94:5:1), hexana : etil asetat (1:1) dan etanol 96% : kloroform (7:3). Kemudian diamati dibawah sinar UV dengan panjang gelombang 254 nm, noda diidentifikasi dengan Rf kurkuminoid pembanding. Fase gerak yang

memberikan pemisahan terbaik, selanjutnya digunakan untuk analisa seluruh kalus dengan menotolkan 16 µl ekstrak metanol.

- Penetapan kadar kurkuminoid larutan uji. Bercak kromatogram diamati dengan KLT densitometer pada panjang gelombang 368 nm. Berdasarkan luas area yang diperoleh selanjutnya kadar kurkuminoid pada ekstrak rimpang, tunas dan kalus temulawak dihitung menggunakan persamaan regresi linier kurva baku kurkuminoid standar. Kadar yang terkandung pada bercak selanjutnya dikonversikan terhadap berat ekstrak kering hingga diperoleh kadar kurkuminoid (%) dalam kalus kering.

Kombinasi perlakuan hormon 2,4-D dan prekursor fenilalanin

Perlakuan		Konsentrasi fenilalanin (ppm)		
		0	2	4
Konsentrasi 2,4-D (ppm)	0	D 0 Fa 0	D 0 Fa 2	D 0 Fa 4
	2	D 2 Fa 0	D 2 Fa 2	D 2 Fa 4
	4	D 4 Fa 0	D 4 Fa 2	D 4 Fa 4

7. HASIL DAN PEMBAHASAN

Waktu eksplan membentuk kalus (pengalusan)

Hasil perhitungan rata-rata pembentukan kalus seperti terlihat pada tabel 2. Hormon 2,4-D dengan konsentrasi 4 ppm menghasilkan waktu induksi kalus tercepat. Tidak terdapat perbedaan

pengaruh waktu induksi kalus akibat pemberian hormone 2,4-D dengan konsentrasi 2 ppm dan 0 ppm. Hal ini diartikan bahwa konsentrasi hormone masih terlalu sedikit untuk bisa mempengaruhi waktu induksi kalus.

Tabel 2. Waktu pembentukan kalus temulawak.

Perlakuan	Konsentrasi (ppm)		Rata-rata waktu pembentukan kalus (hari)
	2,4-D	Fenilalanin	
D 0 Fa 0	0	0	30
D 0 Fa 2	0	2	28
D 0 Fa 4	0	4	32
D 2 Fa 0	2	0	36
D 2 Fa 2	2	2	34
D 2 Fa 4	2	4	38
D 4 Fa 0	4	0	25

D 4 Fa 2	4	2	25
D 4 Fa 4	4	4	27

Prosentase pembentukan kalus

Terlihat pada tabel 3 bahwa perlakuan hormon 2,4-D dan prekursor fenilalanin berpengaruh tidak konsisten

terhadap prosentase pembentukan kalus. Prosen keberhasilan pembentukan kalus tidak dipengaruhi oleh pemberian ke dua perlakuan.

Tabel 3. Prosentase keberhasilan kultur jaringan temulawak

Jenis Perlakuan	Jumlah ulangan	Jumlah eksplan yang membentuk kalus	Prosentase keberhasilan (%)
D 0 Fa 0	7	6	85,71
D 0 Fa 2	7	5	71,43
D 0 Fa 4	7	4	57,14
D 2 Fa 0	7	2	28,57
D 2 Fa 2	7	5	71,43
D 2 Fa 4	7	4	57,14
D 4 Fa 0	7	6	85,71
D 4 Fa 2	7	5	71,43
D 4 Fa 4	7	5	71,43

Uji reaksi warna

Hasil uji reaksi warna menunjukkan dalam rimpang dan kalus mengandung senyawa kurkuminoid yang ditunjukkan oleh terbentuknya warna merah jingga dengan penambahan NaOH 5% (b/v) (basa) dan warna merah dengan pereaksi asam sulfat pekat alkohol 95% (1:1) (asam) (data tidak ditampilkan).

Analisis kurkuminoid secara KLT

Analisa kurkuminoid dilakukan terhadap semua kalus menggunakan fase gerak CHCl₃ : etanol 96% : asam asetat glasial dengan perbandingan 45:5:1. Hasil KLT seluruh kalus, rimpang dan tunas temulawak bahwa ekstrak rimpang, tunas, kalus temulawak dan standart kurkuminoid memiliki warna yang sama yaitu kuning kecoklatan dengan rentang nilai hRf 60-65 untuk kurkumin dan 44 – 46 untuk Desmetoksi kurkumin

Berdasarkan kepolaran kurkuminoid standar terhadap fase gerak maka bercak yang muncul pada hRf 60-65 adalah kurkumin, sedangkan pada hRf 44-46 merupakan desmetoksi-kurkumin,

bercak bisdesmetoksi-kurkumin muncul pada hRF 40. Bercak yang tampak pada rimpang, tunas dan kalus temulawak adalah kurkumin dan desmetoksi-kurkumin.

Penetapan kadar kurkuminoid dalam tunas, rimpang, dan kalus temulawak

Penetapan kadar kurkuminoid diawali dengan penetapan kurva baku kurkuminoid standart. Hasil perhitungan menghasilkan 2 kurva baku, yaitu :

1. Kurva baku kurkumin standart :
 $Y = 563,5785 + 1835,7751x$
2. Kurva baku Desmetoksi kurkumin :
 $Y = 520,9960 + 1592,2618x$

Bercak pada kromatogram yang diperoleh dari penotolan 16 µl ekstrak metanol kalus, rimpang dan tunas temulawak dengan fase diam silika GF₂₅₄ dan fase gerak CHCl₃ : etanol 96% : asam asetat glasial (94:5:1) ditetapkan harga luas area menggunakan KLT densitometer. Luas area dari pembacaan KLT densitometer dapat dilihat pada tabel 4

Tabel 4. Luas area bercak dari kromatogram ekstrak tunas, rimpang, dan kalus temulawak pada fase diam silika GF₂₅₄ dan fase gerak CHCl₃ : etanol 96% : asam asetat glasial (94:5:1)

Replikasi	Perlakuan	Luas area	
		Kurkumin	Desmetoksi-kurkumin
Lempeng A	Tunas	4159,305	11183,57
	Rimpang	1630,888	2398,736
	D 0 Fa 0	814,374	537,397
	D 0 Fa 2	1376,099	956,713
	D 0 Fa 4	1473,544	869,581
	D 2 Fa 2	1589,684	1215,387
	D 2 Fa 4	1048,464	639,643
	D 4 Fa 0	2091,343	1231,96
	D 4 Fa 2	2440,606	1571,335
	D 4 Fa 4	1990,483	1575,261
Lempeng B	Tunas	11018,62	6887,365
	Rimpang	3181,001	1243,916
	D 0 Fa 0	769,124	947,084
	D 0 Fa 2	1216,474	941,57
	D 0 Fa 4	1252,501	485,994
	D 2 Fa 2	824,455	716,84
	D 2 Fa 4	719,95	324,484
	D 4 Fa 0	1105,345	725,938
	D 4 Fa 2	1799,937	1159,313
	D 4 Fa 4	1763,421	1219,955
Lempeng C	Tunas	12513,45	8758,969
	Rimpang	4705,089	630,254
	D 0 Fa 0	2079,128	1020,743
	D 0 Fa 2	1971,172	684,029
	D 0 Fa 4	1153,572	640,787
	D 2 Fa 2	887,05	345,229
	D 2 Fa 4	1559,128	738,248
	D 4 Fa 0	2475,998	1199,254
	D 4 Fa 2	2092,765	1028,032
	D 4 Fa 4	3645,502	709,955

Berat kalus basah yang terbentuk dengan perlakuan hormon 2,4-D 2 ppm dan tanpa Fenilalanin sebesar 0,718 gram. Setelah dikeringkan dan diuapkan diperoleh berat ekstrak kering sebesar 0,024 gram dengan rendemen 42,8571%. Setelah dianalisis dengan KLT bercak tidak tampak, diduga karena terlalu sedikit berat ekstrak kering yang diperoleh.

Banyaknya kontaminasi juga salah satu sebab diperolehnya berat ekstrak kering yang sedikit.

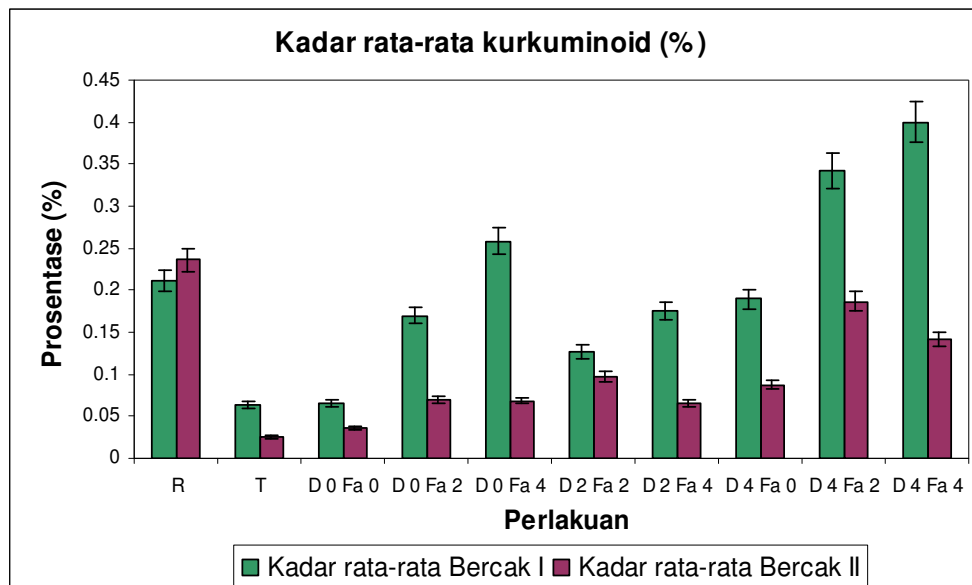
Luas area hasil KLT dimasukkan dalam persamaan regresi linier kurkuminoid standar. Hasil perhitungan kadar kurkuminoid ekstrak tunas, rimpang, dan kalus temulawak dapat dilihat pada tabel 5.

Tabel 5. Hasil perhitungan kadar kurkuminoid ekstrak tunas, rimpang, dan kalus temulawak

Replikasi	Perlakuan	Kadar (%) terhadap rimpang	
		Kurkumin	Desmetoksi-kurkumin
Lempeng A	Tunas	0,0874	0,299
	Rimpang	0,026	0,0526
	D 0 Fa 0	0,0249	0,0019
	D 0 Fa 2	0,1441	0,0891
	D 0 Fa 4	0,3227	0,1425
	D 2 Fa 2	0,2426	0,1893
	D 2 Fa 4	0,1557	0,0439
	D 4 Fa 0	0,2185	0,1173
	D 4 Fa 2	0,415	0,2677
D 4 Fa 4	0,2699	0,2299	
Lempeng B	Tunas	0,2542	0,1785
	Rimpang	0,0637	0,0203
	D 0 Fa 0	0,0204	0,0488
	D 0 Fa 2	0,1158	0,086
	D 0 Fa 4	0,2443	0,0143
	D 2 Fa 2	0,0617	0,0534
	D 2 Fa 4	0,0502	0,0728
	D 4 Fa 0	0,0775	0,0338
	D 4 Fa 2	0,2733	0,1627
D 4 Fa 4	0,2269	0,1524	
Lempeng C	Tunas	0,2906	0,231
	Rimpang	0,1007	0,0031
	D 0 Fa 0	0,1504	0,0572
	D 0 Fa 2	0,2496	0,0333
	D 0 Fa 4	0,2092	0,049
	D 2 Fa 2	0,0765	0,0479
	D 2 Fa 4	0,3198	0,0804
	D 4 Fa 0	0,2736	0,1119
	D 4 Fa 2	0,3381	0,1292
D 4 Fa 4	0,5829	0,0412	

Dari hasil perhitungan yang diperoleh kemudian dibuat rata-rata kadar kurkuminoid ekstrak tunas, rimpang, dan

kalus temulawak yang dapat dilihat pada grafik 1.



Grafik 1. Hubungan antara perlakuan media terhadap prosentase kadar rata-rata kurkumin(bercak I) dan desmetoksi-kurkumin (bercakII)

Berdasarkan grafik 1 dapat dilihat bahwa kadar kurkuminoid dalam rimpang lebih besar dibanding dalam tunas temulawak. Hal ini dikarenakan rimpang adalah organ penyimpanan metabolit baik primer maupun sekunder, sehingga deposit metabolit lebih banyak dibanding di bagian tunas. Kadar kurkumin dan desmetoksi-kurkumin dalam kalus pada semua perlakuan media mengalami peningkatan bila dibanding dalam tunas. Kadar kurkumin dalam kalus lebih tinggi dari pada desmetoksi-kurkumin dalam perlakuan yang sama.

Grafik diatas menunjukkan adanya perbedaan kadar kurkumin dan desmetoksi-kurkumin. Perlakuan hormon 2,4-D 4 ppm dan Fenilalanin 4 ppm menghasilkan kadar kurkumin paling banyak, yakni sebesar 0,39%, sementara kadar desmetoksi-kurkumin terbanyak dihasilkan oleh hormon 2,4-D 4 ppm dan Fenilalanin 2 ppm sebesar 0,18 %. Hal ini

menunjukkan bahwa sampai dengan konsentrasi 4 ppm kedua macam perlakuan masih belum menunjukkan titik optimum untuk menghasilkan senyawa kurkuminoid.

8. KESIMPULAN

Pertama, penambahan hormon 2,4-D dengan konsentrasi 4 ppm berpengaruh terbesar terhadap induksi pembentukan kalus rimpang temulawak.

Kedua, penambahan prekursor fenilalanin dengan konsentrasi 4 ppm berpengaruh terbesar terhadap kadar kurkumin dan konsentrasi 2 ppm berpengaruh terbesar terhadap kadar desmetoksi-kurkumin pada kalus rimpang temulawak.

Ketiga, kombinasi penggunaan hormon 2,4-D dan fenilalanin dalam kultur in vitro berpengaruh terhadap kandungan kurkuminoid kalus.

DAFTAR PUSTAKA

- Afifah, E., dan Tim Lentera, 2004, *Khasiat Dan Manfaat Temulawak*, Agromedia Pustaka, Jakarta, 9, 35.
- Dalimantha, S., 2000, *Atlas Tumbuhan Obat Indonesia, jilid II*, Trubus Agriwidya, 182, 184, 185.
- Dewick, P.M., 1997, *Medicina INatural Products A biosynthetic Approach*, Department of Pharmaceutical Sciences, University of Nottingham, UK, 109-119.
- Dodds, J.H., dan Roberts, L.W., 1982, *Plant Tissue Culture*, Cambridge University Press, USA, 10-49.
- George, E.R., and Sherrington, L.R., 1984, *Plant Propagation By Tissue Culture*, Exegetic Press Inc, Orlando San Diego, 288, 334.
- Harborne, J.B., 1987, Metode Fitokimia, *Penuntun Cara Modern Menganalisa Tumbuhan*, diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata dan Iwang Sudiro, ITB, 58, 319.
- Hardjasoemantri, K., 1987, *Buku Risalah Seminar Nasional metabolit Sekunder*, Pusat antar Universitas Bioteknologi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, 7.
- Heddy, S., 1983, *Hormon Pertumbuhan*, Rajawali, Jakarta, 2, 5-7, 11, 18-19.
- Hendaryono, D.P.S., dan Wijayani, A., 1994, *Teknik Kultur Jaringan*, Edisi II, Kanisius, Yogyakarta.
- Indrayanto, G., 1987, *Produksi Metabolit Sekunder Dengan Teknik Kultur Jaringan Tanaman*, Pusat antar Universitas Bioteknologi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, 32.
- Merari, J., 2006, *Petunjuk Praktikum Farmakognosi II*, Universitas Setia Budi, Surakarta, 8.
- Muhlisah, F., 1999, *Temu-temuan dan Empon-emponan Budi Daya dan Manfaatnya*, Kanisius, Yogyakarta, 70-72.
- Mulja, H.M, dan Suharman, 1995, *Analisis Instrumental*, Airlangga University Press, Surabaya, 223-225.
- Nugroho, A., dan Sugito, H., 2004, *Pedoman Pelaksanaan Teknik Kultur Jaringan*, Penebar Swadaya.
- Rukmana, R., 1995, *Temulawak Tanaman Rempah dan Obat*, Kanisius, Yogyakarta, 11-17.
- Sidik, M.W., dan Ahmad M., 1994 *Temulawak (Curcuma xanthoriza, Roxb) Pengembangan Obat Bahan Alam*, Phyto Medica, Jakarta, 11-40.
- Stahl, E., 1985, *Analisis Obat Secara Kromatografi dan Mikroskopi.*, diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata dan Iwang Sudiro, Edisi II, ITB, Bandung, 3, 16-17.
- Tonnesen, H.H., 1986, *Chemistry Stability and Analysis Of Curcumin*, Institute of Pharmacy University of Oslo, Oslo, Norway.
- Untung, S., dan Fatimah, N., 2003, *Kultur Jaringan Tanaman*, Universitas Muhammadiyah Malang, Malang.
- Wetheral, D.F., 1982, *Pengantar Propagasi Tanaman Secara In Vitro*, diterjemahkan oleh Koensoemardiyah, S., IKIP Press, Semarang.