

PENGARUH BAP DAN NAA TERHADAP INDUKSI KALUS DAN KANDUNGAN ARTEMISININ DARI *Artemisia annua* L.¹
[The Effect of BAP and NAA on Callus Induction and Artemisinin Content of *Artemisia annua* L.]

RagapadmiPurnamaningsih¹- dan Misky Ashrina
Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian
Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian
Jin Tentara Pelajar No. 3 A, Bogor
•e-mail: raga_padmi@yahoo.com

ABSTRACT

Malaria is a global health problem that threatens 300-500 million people and kills more than one million people annually. Artemisinin, a sesquiterpen secondary plant metabolite extracted from *Artemisia annua* L., is a promising and potent antimalarial drug which has a remarkable activity against chloroquine resistant to *Plasmodium falciparum*. To counter the present low content (0.01-0.5%) of artemisinin in *A. annua* L. is a limitation to commercial production of the drug and uneconomical chemical synthesis. A research was conducted to induce callus production by using Murashige-Skoog (MS) medium added with NAA (0, 0.5 and 1 mg/l) and BAP (0, 0.5 dan 1 mg/l) and also to produce artemisinin from the calli. Complete Randomized Design was used in the research. Callus cultures were induced from leaf explants of *A. annua*. The research reports successful approach for production of artemisinin by callus cultures of *A. Annua*. Medium formulation of MS basal media added with plant growth regulators BAP 0.5 mg/l and NAA 0.5 mg/l give the best result for callus induction than others, with callus fresh weight 844,4 mg, artemisinin content 0.73%, dry weight 216.6 mg and total weight of artemisinin 1.58 mg.

Key words: *Artemisia annua* L, callus induction, artemisinin content.

ABSTRAK

Malaria merupakan penyakit berbahaya yang telah menyerang 300-500 juta manusia dan menyebabkan kematian bagi lebih dari 1 juta penderita. Penyebab penyakit ini *Plasmodium falciparum*, telah resisten terhadap obat malaria yang telah lama digunakan. Artemisinin merupakan produk metabolit sekunder dari tanaman *Artemisia annua* L. yang sangat efektif terhadap *Plasmodium falciparum*. Permasalahan yang dihadapi dalam pengembangan tanaman ini adalah kandungan artemisinin dari *Artemisia annua* yang ditanam di Indonesia masih sangat rendah, yaitu berkisar 0.1-0.5 %, sedangkan untuk membuat artemisinin secara sintesis sangat sulit dan mahal sehingga tidak ekonomis untuk dikembangkan dalam skala luas. Penelitian ini bertujuan untuk memproduksi artemisinin melalui kultur *in vitro*, yaitu melalui kultur kalus. Induksi kalus dilakukan dengan menggunakan media MS dengan penambahan NAA (0, 0.5 and 1 mg/l) dan BAP (0, 0.5 dan 1 mg/l). Rancangan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap. Eksplan yang digunakan untuk menginduksi pembentukan kalus adalah daun dari *A. annua*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa artemisinin dapat dihasilkan melalui kultur kalus *A.annua*. Formulasi media terbaik untuk induksi kalus adalah MS dengan penambahan BAP 0.5 mg/l dan NAA 0.5 mg/l dengan bobot basah kalus 844,4 mg, bobot kering kalus 216,6 mg, kandungan artemisinin 0,73%, dan bobot total artemisinin 1,58 mg.

Kata kunci: *Artemisia annua* L, induksi kalus, kandungan artemisinin.

PENDAHULUAN

Penyakit malaria ialah penyakit yang cukup serius, telah menyerang kurang lebih 275 juta populasi manusia di dunia dan menyebabkan satu juta orang meninggal setiap tahunnya (Butler, 1997). Di Indonesia penyakit malaria yang disebabkan oleh *Plasmodium falciparum* merupakan salah satu penyakit dengan jumlah penderita malaria yang tergolong tinggi dan berbahaya, yang termasuk sebagai penyebab kematian utama sebanyak 1,2 % dari total kematian. Lebih dari 600 juta kasus di dunia terinfeksi penyakit ini, dan menyebabkan 1,7 - 2,5 juta orang/tahun mengalami kematian (WHO, 2004).

Di lain pihak, parasit malaria berupa *Plasmodium falciparum* telah resisten terhadap obat malaria yang biasa digunakan, sehingga perlu dikembangkan obat anti malaria yang baru. Artemisinin merupakan produk metabolit sekunder dari tanaman *Artemisia annua* L. yang sangat efektif terhadap *Plasmodium falciparum* dan telah direkomendasikan oleh WHO sebagai bahan baku obat malaria. Namun demikian hingga saat ini obat berbahan baku artemisinin masih diimpor, padahal setiap tahun kebutuhan akan obat malaria sangat tinggi di Indonesia. Untuk membuat artemisinin secara sintesis sangat sulit dan sangat mahal, maka cara yang paling mudah dan murah untuk memperoleh artemisinin

adalah dengan mengekstrak dari tanamannya (Simon *etal.*, 1990; Charles *etal.*, 1990).

Permasalahan yang dihadapi tanaman *Artemisia* yang ada di Indonesia adalah kandungan bahan aktif yang rendah yaitu berkisar 0,01 - 0,5% dari bobot kering (Delabays *et al.*, 2001). Kandungan yang relatif kecil ini dapat menimbulkan kerugian bagi pengusaha yang akan mengembangkan dalam skala industri karena dianggap tidak efisien. Teknik kultur jaringan tumbuhan dapat dimanfaatkan untuk mengatasi permasalahan tersebut. Melalui teknik ini, metabolit sekunder yang dihasilkan dalam jaringan tanaman utuh dapat dihasilkan juga dalam sel-sel yang dipelihara pada medium buatan secara aseptik. Pemanfaatan teknik kultur jaringan tanaman dengan kultur kalus adalah salah satu cara untuk menghasilkan senyawa metabolisme sekunder (George dan Sherrington, 1994; Baldi dan Dixit, 2008).

Beberapa keuntungan pemanfaatan teknik kultur jaringan dalam produksi senyawa metabolit sekunder dibandingkan dengan cara konvensional antara lain: (1) menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang lebih konsisten dalam waktu lebih singkat (2) faktor lingkungan dapat diatur dan dikendalikan sehingga tidak akan dipengaruhi oleh iklim, hama dan penyakit, musim dan faktor lainnya (3) mutu dari senyawa metabolit sekunder yang diproduksi lebih baik dan sistem produksi yang dapat diatur (Ernawati, 1992).

Kultur kalus selain dapat digunakan untuk teknik perbanyakan tanaman juga merupakan salah satu cara untuk memproduksi senyawa metabolit sekunder (George dan Sherrington, 1994). Pada kultur kalus, pemberian zat pengatur tumbuh (ZPT), baik auksin maupun sitokinin, sangat diperlukan. Penggunaan ZPT tersebut secara tunggal atau kombinasi dengan konsentrasi yang tepat diharapkan dapat menginduksi dan meningkatkan pertumbuhan kalus sehingga didapatkan biomassa yang besar. Auksin jenis NAA dan sitokinin jenis BAP sudah umum digunakan dalam kultur kalus untuk menghasilkan senyawa metabolit sekunder. Bhojwani dan Razdan (1996), menyatakan bahwa zat pengatur tumbuh berpengaruh terhadap pertumbuhan dan diferensiasi sel serta produksi senyawa metabolit sekunder dalam teknik kultur

jaringan.

Induksi kalus sangat dipengaruhi oleh konsentrasi auksin. Sebagaimana dilaporkan oleh Nr *et al.* (1996) bahwa penggunaan 2.22 mM BAP dan 2.69 mM NAA dapat menginduksi pembentukan kalus *Artemisia absinthium*. Selanjutnya Zia *et al.* (2005) melaporkan bahwa penambahan BAP baik dengan NAA, 2-4 D atau IB A mampu menghasilkan respon pembentukan kalus 100% pada tanaman *A. absinthium*. Benjamin *et al.* (1991) menyebutkan bahwa induksi kalus dapat dilakukan dari tunas pucuk menggunakan BAP dan IAA pada *Artemisia pallens*. Penambahan 2 4 D (0,05 - 0,25 mg/l) dikombinasikan dengan BAP (0,5 mg/l) mampu memproduksi kalus dengan warna hijau muda dengan struktur yang remah.

Dari berbagai hasil penelitian tersebut, terlihat bahwa respon induksi kalus dan produksi kalus tergantung kepada genotipe tanaman, jenis eksplan serta formulasi media yang digunakan. Dengan diketahuinya metode produksi artemisinin melalui kultur kalus, maka produksi artemisinin untuk bahan baku obat malaria dapat dihasilkan melalui kultur kalus.

Tujuan penelitian ini adalah memperoleh formulasi media yang tepat untuk menginduksi pembentukan kalus dengan biomassa yang besar serta kandungan artemisinin yang tinggi.

BAHENDAN METODE

Bahan yang digunakan sebagai sumber eksplan adalah daun dari biakan *A. annua* steril di dalam botol. Media dasar yang digunakan adalah Murashige-Skoog (MS), sedangkan zat pengatur tumbuh yang ditambahkan adalah BAP dan NAA. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biologi Sel dan Jaringan (BSJ), Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian (BB-Biogen), Bogor.

Daun yang dipilih yaitu daun muda pada ruas ke 2-4. Daun dipotong dengan ukuran 0,5 x 0,5 cm dan ditanam pada media perlakuan dan kemudian kultur diinkubasi pada ruang kultur dengan suhu 22-25°C dalam keadaan gelap. Formulasi media yang digunakan adalah media MS dengan penambahan zat pengatur tumbuh BAP dan NAA dengan konsentrasi yang berbeda, dengan perlakuan sebagai berikut:

1. BAP 0 mg/1 dan NAA 0 mg/1 (B_0N_0 /Kontrol)
2. BAP 0 mg/1 dan NAA 0,5 mg/1 ($B_0N_{0,5}$)
3. BAP 0 mg/1 dan NAA 1,0 mg/1 (B_0N_1)
4. BAP 0,5 mg/1 dan NAA 0 mg/1 ($B_{0,5}N_0$)
5. BAP 0,5 mg/1 dan NAA 0,5 mg/1 ($B_{0,5}N_{0,5}$)
6. BAP 0,5 mg/1 dan NAA 1,0 mg/1 ($B_{0,5}N_{1,0}$)
7. BAP 1,0 mg/1 dan NAA 0 mg/1 (B_1N_0)
8. BAP 1,0 mg/1 dan NAA 0,5 mg/1 ($B_1N_{0,5}$)
9. BAP 1,0 mg/1 dan NAA 1,0 mg/1 (B_1N_1)

Kemasaman media dibuat menjadi 5.8 dengan NaOH atau HCl. Sebagai pematat ditambahkan agar 8 g/1. Media yang sudah diramu dipanaskan dalam autoclave pada suhu 121°C.

1. Pengamatan dilakukan pada saat kalus berumur 2 minggu setelah inisiasi dan setiap dua minggu sekali hingga kalus berumur enam minggu. Perubahan yang diamati adalah 1) saat inisiasi kalus, dihitung pada saat hari setelah tanam sampai kalus mulai terbentuk, 2) persentase pembentukan kalus, dihitung dengan rumus eksplan yang membentuk kalus/total jumlah eksplan x 100%, 3) visual kalus yang meliputi pengamatan warna dan tekstur kalus, 4) Bobot basah kalus yang ditimbang setiap dua minggu sekali mulai dari minggu kedua setelah inisiasi kalus sampai pada minggu keenam dilakukan di dalam *laminar airflow cabinet* dengan menggunakan timbangan analitik digital, 5) bobot kering kalus yang dipanen dari kalus umur 6 minggu setelah tanam dan kemudian kalus dikeringanginkan dua sampai tiga hari kemudian ditimbang bobot keringnya, 6) kadar air kalus, dan 7) kandungan artemisinin dari kalus dengan menggunakan analisis TLC (*Thin Layer Chromatography*) yang dilakukan sebagai berikut: Sebanyak $\pm 0,1$ g ditambahkan methanol, dimasukkan ke dalam labu ukur 5 ml, dikocok selama 2 jam, kemudian didiamkan selama 24 jam. Disaring menggunakan kertas Whatman 41. Ditotolkan pada plat aluminium silica 254 F sebanyak 5 ul bersamaan dengan larutan standar artemisinin dengan konsentrasi 100 ppm sebanyak 5 ul. Dielusi dalam chamber dengan eluen diklorometan: etil asetat selama ± 7 jam. Dikeringanginkan kemudian diukur dengan menggunakan TLC-scanner dengan panjang gelombang $X=225$ nm.

Perhitungan:

$$\frac{\text{Luas Area cts Vets}}{\text{mg cts}} \times 100\%$$

$$\frac{\text{Luas Area standar}}{\text{ppm standar}} \times V \text{ cts (L)} \times Fp \text{ (V labu)}$$

Bobot total artemisinin pada kalus, dihitung dengan bobot kering kalus dikalikan dengan persentase kandungan artemisinin dari kalus.

Rancangan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 20 ulangan. Untuk mengetahui pengaruh perlakuan yang diberikan, data dianalisis dengan menggunakan analisis ragam (uji F) dan apabila berbeda nyata maka dilanjutkan dengan uji BNT pada taraf 5% dan 1%.

HASIL

Pembentukan kalus pada berbagai formulasi media disajikan pada Tabel 1 meliputi persentase pembentukan kalus, deskripsi struktur kalus dan warna kalus mulai dari minggu kedua setelah inisiasi kalus sampai dengan minggu keenam setelah inisiasi kalus, sedangkan gambar visual kalus dari minggu kedua sampai minggu keenam setelah inisiasi dapat dilihat pada Gambar 1. Waktu pembentukan kalus yang paling cepat adalah dua minggu setelah tanam. Pada minggu pertama untuk semua perlakuan MS dengan penambahan BAP (0,0,5 mg/1 dan 1 mg/1) dan NAA (0, 0,5 mg/1 dan 1 mg/1) belum menunjukkan respon yang berarti. Pada minggu kedua mulai terlihat pembengkakan di bekas potongan (luka) pada daun, hal ini berarti BAP dan NAA mulai diserap oleh jaringan daun. Pada perlakuan $B_{0,5}N_{0,5}$, $B_{0,5}N_0$ dan B_1N_1 , pada 15 hst (hari setelah tanam) sudah mulai menunjukkan inisiasi pembentukan kalus sedangkan pada perlakuan yang lainnya inisiasi kalus baru terjadi pada minggu ketiga dan keempat. Pada umumnya perlakuan BAP dan NAA secara keseluruhan mampu menginduksi terbentuknya kalus, kecuali pada perlakuan kontrol (B_0N_0) kalus tidak terbentuk.

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa pada minggu kedua sampai pada minggu keempat untuk keseluruhan perlakuan menunjukkan struktur kalus yang remah. Sedangkan jika dilihat dari warna kalus, pada minggu kedua kalus berwarna putih kekuningan dan kekuningan. Pada minggu keempat, kalus remah berwarna kuning kecoklatan tampak pada perlakuan

Tabel 1. Induksi kalus *Artemisia annua* pada berbagai formulasi media.

No	Formulasi media (mg/l)	inisiasi kalus (hat)	Pembentukan Kalus (%)	Struktur kalus			Warna kalus		
				2msi	4msi	6msi	2msi	4msi	6msi
1	B ₀ N ₀ (BAPONAAO)	-	0	Tidak terbentuk kalus					
2	B ₀ N _{0.5} (BAPONAA0,5)	25	100	remah	remah	remah	putih kekuningan	kekuningan	kuning kecoklatan
3	B ₀ N, (BAPONAA1)	25	100	remah	remah	remah	kekuningan	kecoklatan	kecoklatan
4	B _{0.5} N ₀ (BAP0,5NAA0)	30	100	remah	remah	remah	kekuningan	kuning kecoklatan	kuning kecoklatan
5	B _{0.5} N _{0.5} (BAP 0,5 NAA 0,5)	15	100	remah	remah	remah	kekuningan	kekuningan	kekuningan
6	B _{0.5} N, (BAP 0,5 NAA 1)	15	100	remah	remah	remah	putih kekuningan	kekuningan	kecoklatan
7	B, ₀ N ₀ (BAP 1 NAA 0)	30	100	remah	remah	remah	kekuningan	kekuningan	kuning kecoklatan
8	B. _{0.5} N _{0.5} (BAP 1 NAA 0,5)	20	100	remah	remah	remah	putih kekuningan	kekuningan	kuning kecoklatan
9	B, _{0.5} N, (BAP 1 NAA 1)	15	100	remah	remah	remah	kekuningan	kuning kecoklatan	coklat kehitaman

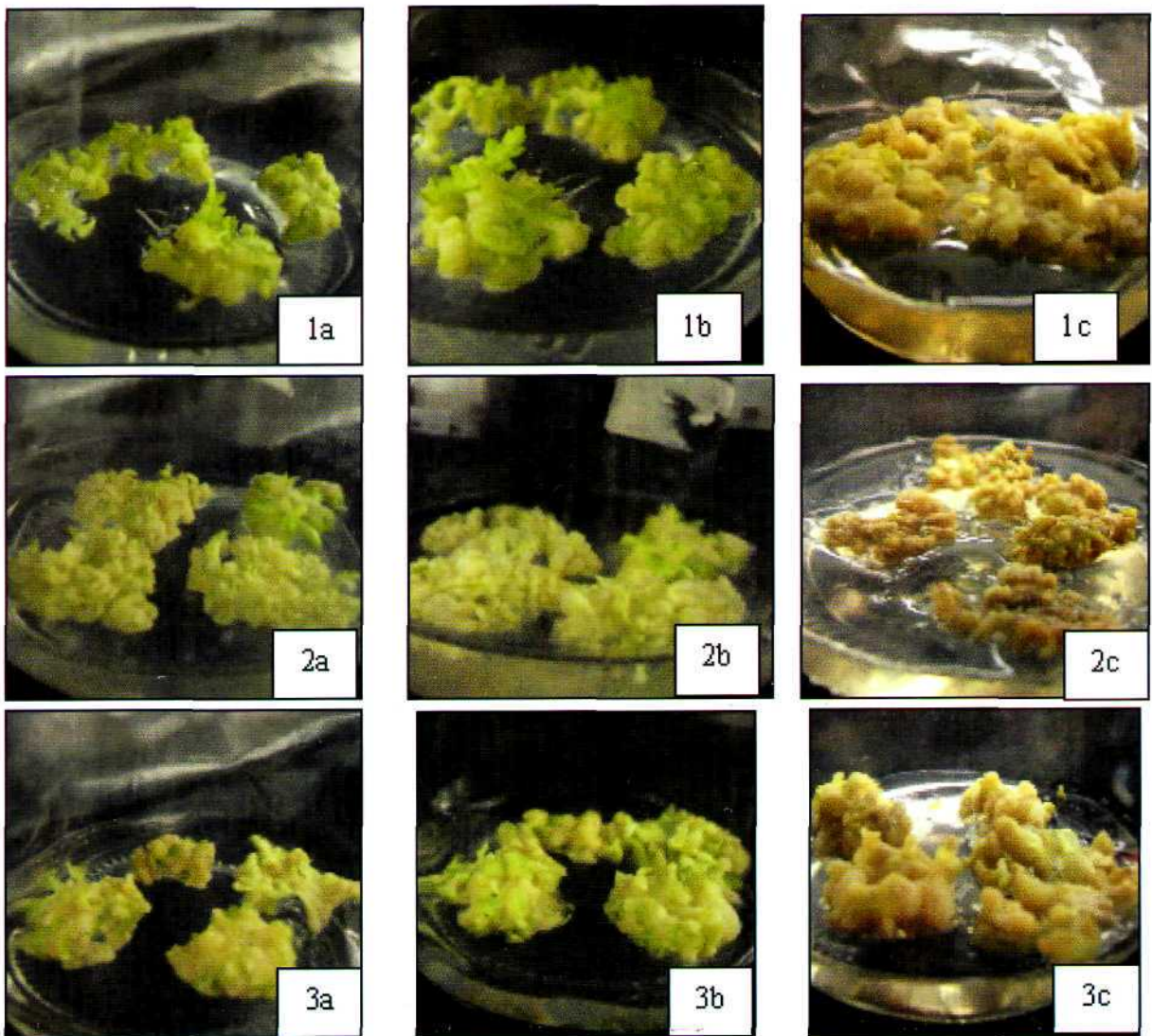
Keterangan: hst= hari setelah tanam, msi= minggu setelah inisiasi.

$B_{0.5}N_0$ dan BJNJ sedangkan pada perlakuan lainnya berwarna kekuningan. Pada minggu keenam sebagian besar kalus berwarna kuning kecoklatan, hanya pada perlakuan $B_{0.5}N_{0.5}$, $B_{0.5}N_{j_0}$ dan $B_{0.0}N_{0.5}$ kalus masih tetap berwarna kekuningan (Gambar 1). Perlakuan kontrol B_0N_0 tidak mampu membentuk kalus sampai pada minggu keenam, tetapi perlakuan kontrol mampu membentuk akar. Dari Tabel 1 dapat dilihat bahwa persentase pembentukan kalus untuk semua formulasi media kecuali media kontrol (BjNg) mencapai 100%.

Penimbangan bobot basah kalus dilakukan pada saat mulai dua minggu setelah inisiasi (msi) kalus

dan untuk selanjutnya setiap dua minggu sekali sampai pada minggu keenam. Data pengamatan bobot basah kalus dimulai pada minggu kedua setelah inisiasi kalus sampai dengan minggu keenam yang disajikan pada Tabel 2.

Penambahan BAP dan NAA secara keseluruhan menunjukkan pengaruh yang nyata terhadap bobot basah kalus yang berasal dari eksplan daun *A. annua*. Terjadi peningkatan bobot kalus pada minggu kedua, keempat dan keenam pada sebagian besar perlakuan. Hanya perlakuan $B_0N_{.}$, $B_{0.5}N_0$, dan B_{jN_i} pada minggu keenam yang menunjukkan bobot basah yang



Gambar 1. Induksi kalus pada media (1) $B_{0.5}N_{0.5}$ (2) $B_wN_{j_0}$ (3) $B_{0.0}N_{0.5}$
a. umur 2 msi, b. 4 msi, dan c. 6 msi

Tabel 2. Bobot Basah Kalus *Artemisia annua*

Formulasi media (mg/l)	Bobot basah kalus (mgg) umur ke-					
	2msi		4 msi		6 msi	
B ₀ N ₀	0	A	0	a	0	a
B ₀ N _{0,5}	263,2	Be	301,1	be	325,7	be
B₀N_j	240,0	Be	321,5	be	308,9	be
B _{0,5} N ₀	203,4	B	257,3	b	247,3	b
B _{0,5} N _{0,5}	451,4	C	707,7	d	844,4	d
B _c sN ₁	397,1	C	558,5	cd	641,5	cd
BiN ₀	431,9	C	514,9	cd	610,6	c
BiN _{0,5}	358,2	C	453,2	be	468,5	c
BiN ₁	439,2	C	484,4	c	476,8	c
BNT 5 %	119,66	**	196,51	**	220,58	**

Keterangan: Notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan nyata pada uji BNT taraf nyata 5 % dan 1 %

B₀N₀ = BAP 0 dan NAA 0 mg/l,

B₀N₁ = BAP 0 dan NAA 1 mg/l,

B_{0,5}N_{0,5} = BAP 0,5 mg/l dan NAA 0,5 mg/l,

B₁N₀ = BAP 1 mg/l dan NAA 0 mg/l

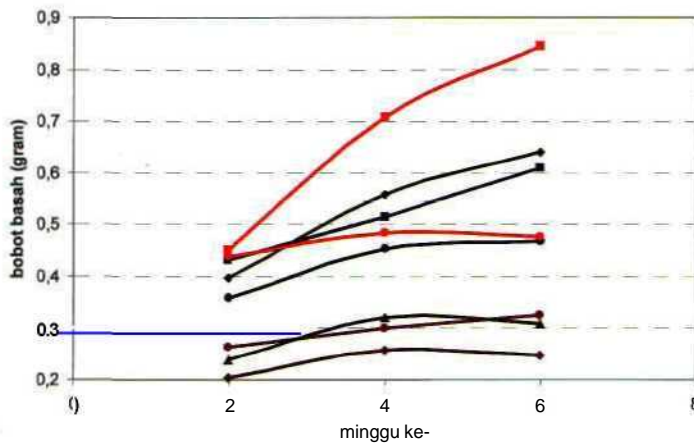
B_jN₁ = BAP 1 mg/l dan NAA 1 mg/l

B₀N_{0,5} = BAP 0 dan NAA 0,5 mg/l,

B_{0,5}N₀ = BAP 0,5 mg/l dan NAA 0 mg/l,

B_{0,5}N₁ = BAP 0,5 mg/l dan NAA 1 mg/l,

B₁N_{0,5} = BAP 1 mg/l dan NAA 0,5 mg/l,



Gambar 2. Grafik Pertumbuhan Kalus *Artemisia annua*.

menurun.

Berdasarkan Tabel 2 dapat dilihat bahwa penambahan BAP 0,5 mg/l dan NAA 0,5 mg/l (B_{0,5}N_{0,5}) menghasilkan bobot basah kalus tertinggi tetapi tidak berbedanya dengan BAP 0,5 mg/l NAA 1 mg/l (B_{0,5}N₁).

Gambar 2 menunjukkan grafik pertumbuhan kalus *A. annua* dari umur 2-6 mg. Dari grafik tersebut terlihat bahwa perlakuan B_{0,5}N_{0,5} menunjukkan laju pertumbuhan tertinggi sampai pada minggu keenam. Kemudian diikuti oleh perlakuan B₀^AN_j Pada perlakuan

B^AN^A pada minggu terakhir masih memperlihatkan fase eksponensial, tetapi pada perlakuan yang lainnya terlihat sudah banyak yang memasuki fase stasioner. Perlakuan yang menunjukkan laju terendah pertumbuhan kalus *Artemisia* adalah perlakuan B₅N₀.

Pada minggu ke-6 dilakukan pengamatan terakhir pertumbuhan kalus, kemudian kalus dipanen dan dikeringkan untuk mendapatkan data bobot kering kalus. Selanjutnya dilakukan analisis kandungan artemisinin. Tabel 3 dibawah ini menunjukkan data bobot basah minggu ke-6, bobot kering, kadar air,

label 3. Bobot Basah minggu ke-6, Bobot Kering, Kadar air, Kandungan Artemisinin, Bobot Total Artemisinin pada kalus *Artemisia annua*

Formulasi media (mg/l)	Bobot basah kalus minggu ke-6 (nig)	Bobot kering kalus (mg)	Kadar air (%)	Kandungan Artemisinin (% bobot kering)	Bobot Total Artemisinin (mg)
BoNo	0 a	0 a	0	0	0
B ₀ N _{0,5}	325,7 be	143,4 b	55,97	0,75	1,08
BoN,	308,9 be	153,4 be	50,34	0,75	1,15
B _{0,5} N ₀	247,3 b	128,6 b	48,00	0,69	0,89
B _{0,5} N _{0,5}	844,4 d	216,6 c	74,35	0,73	1,58
B _{0,5} N,	641,5 cd	197,6 c	69,20	0,69	1,36
BjNo	610,6 c	194,2 c	68,20	0,71	1,38
BjNo.5	468,5 c	137,4 b	70,67	0,76	1,04
BiN,	476,8 c	115,6 b	75,76	0,75	0,87
BNT 5 %	220,58 **	46,637 **			

Keterangan: angka didampingi huruf yang sama pada satu kolom menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji BNT 5 % dan 1 %

B₀N₀ = BAP 0 dan NAA 0 mg/l,

B₀N, = BAP 0 dan NAA 1 mg/l,

B_{0,5}N_{0,5} = BAP 0,5 mg/l dan NAA 0,5 mg/l,

B, N₀ = BAP 1 mg/l dan NAA 0mg/l

B, N, = BAP 1 mg/l dan NAA 1mg/l

B₀N_{0,5} = BAP 0 dan NAA 0,5 mg/l,

B_{0,5}N₀ = BAP 0,5 mg/l dan NAA 0 mg/l,

B_{0,5}N, = BAP 0,5 mg/l dan NAA 1 mg/l,

B, N_{0,5} = BAP 1 mg/l dan NAA 0,5 mg/l ,

kandungan artemisinin, dan bobot total artemisinin sebagai berikut.

Bobot kering kalus yang didapatkan dari perlakuan B_{0,5}N_{0,5} lebih besar tetapi tidak berbeda nyata dengan perlakuan B_{0,5}N, dan B, N₀. Perlakuan B_{0,5}N_{0,5} menghasilkan bobot kering sebesar 216,6 mg dengan persentase kadar air sebesar 74,35% dari bobot basah kalus pada minggu keenam. Pada percobaan ini analisis kandungan artemisinin dilakukan pada semua perlakuan. Berdasarkan hasil analisis tersebut diperoleh bahwa perlakuan B, N_{0,5} mempunyai persentase kandungan artemisinin tertinggi yaitu sebesar 0,76%, dilanjutkan secara berturut-turut pada perlakuan B, N_{0,5}, dan B₀N, dengan persentase kandungan artemisinin sebesar 0,75%. Pada perlakuan B_{0,5}N_{0,5} persentase kandungan artemisinin adalah sebesar 0,73%.

Berdasarkan bobot kering kalus dan persentase kandungan artemisinin, maka dapat diketahui bobot total artemisinin yang dihasilkan. Bobot total artemisinin tertinggi (1.58 mg) dihasilkan dari kultur kalus dari formulasi media MS+BAP 0.5mg/l + NAA 0.5 mg/l.

PEMBAHASAN

Pembentukan kalus sangat dipengaruhi oleh jenis eksplan dan zat pengatur tumbuh yang digunakan. Eksplan daun dengan jaringan yang meristematik akan lebih mudah membentuk kalus dibanding dengan jaringan yang sudah tua. Eksplan dari daun lebih banyak mengandung senyawa pektat dan protein.

Berdasarkan hasil percobaan induksi kalus dengan menggunakan eksplan daun *A. annua* didapatkan hasil bahwa penambahan NAA dan BAP berpengaruh terhadap umur inisiasi kalus, pembentukan kalus yang dilihat dari struktur dan warna kalus, bobot basah, bobot kering dan kandungan artemisinin,

Keberhasilan pembentukan kalus sangat dipengaruhi oleh konsentrasi auksin dan sitokinin. Perlakuan B_{0,5}N_{0,5}, B_{0,5}N₁₀ dan B[^], menunjukkan inisiasi kalus yang tercepat yaitu pada 15 hst (hari setelah tanam) sudah mulai menunjukkan inisiasi pembentukan kalus. Sementara itu pada perlakuan yang lainnya inisiasi kalus baru terjadi pada minggu ketiga dan keempat. Hal ini membuktikan bahwa perlakuan dengan kombinasi antara auksin dan sitokinin

memberikan respon yang lebih baik dibandingkan dengan perlakuan auksin dan sitokinin secara tunggal pada induksi kalus *A. annua*. Hal ini didasarkan pada fiingsi auksin yang bersama-sama dengan sitokinin dapat mengatur tipe morfogenesis yang dikehendaki. Walaupun auksin lebih berperan utama untuk pembentukan kalus, namun jika dikombinasikan dengan sitokinin, yang juga berperan dalam proses pembelahan sel dan proliferasi kalus, dapat memberikan respon yang terbaik untuk induksi kalus *A. annua*. konsentrasi yang seimbang ataupun konsentrasi auksin yang lebih tinggi daripada sitokinin mampu meningkatkan laju induksi kalus. Menurut Gunawan (1987), pembentukan kalus dari tanaman dikotil tetap memerlukan sitokinin disamping auksin yang tinggi. Nisbah kombinasi auksin dan sitokinin dengan perbandingan yang seimbang juga mampu meningkatkan laju inisiasi kalus pada tanaman dikotil.

Jika dilihat dari struktur dan warna kalus, pada minggu kedua sampai minggu keempat semua perlakuan mempunyai struktur kalus yang reman yang menunjukkan bahwa kalus tersebut banyak mengandung air (vitrous). Sedangkan jika dilihat dari warna kalus, kalus yang berwarna kekuningan mencirikan diferensiasi sel yang aktif. Kalus yang berwarna kecoklatan menandakan bahwa kalus mulai mengalami oksidasi dan gejala *browning* (pencoklatan) menyebabkan perkembangan kalus menjadi lambat, sehingga proses diferensiasi sel juga berjalan lambat.

Pada Tabel 2 terlihat bahwa penambahan BAP dan NAA menunjukkan pengaruh terhadap bobot basah kalus. Perlakuan $B_{0.5}N_{0.5}$ menunjukkan respon yang lebih baik dibandingkan dengan perlakuan $B_{0.5}N$. Terjadi peningkatan bobot kalus pada minggu keempat dan minggu keenam. Hal ini juga terlihat pada grafik pertumbuhan kalus *A. annua* (Gambar 2). Dari grafik tersebut dapat diduga minggu ke-4 merupakan fase eksponensial, sedangkan minggu ke-6 merupakan fase stasioner. Terdapat lima fase pertumbuhan kalus, yaitu: 1) fase lag, yaitu fase persiapan pembelahan sel, 2) fase eksponensial yaitu fase di mana laju pembelahan sel tertinggi, 3) fase linier, yaitu fase dari pembelahan sel mulai melambat tetapi laju dari perkembangan sel meningkat, 4) fase perlambatan, di mana laju pembelahan sel dan pemanjangan sel menurun, 5) fase

stasioner, di mana jumlah dan ukuran sel konstan stabil.

Pada umumnya senyawa metabolit sekunder mulai terbentuk pada awal fase stasioner. Namun pada beberapa tanaman, produksi metabolit sekunder bisa juga terjadi pada fase pertengahan sampai fase akhir eksponensial. Pada kalus *A. annua* diduga produksi metabolit tertinggi adalah pada fase eksponensial minggu keempat sampai fase stasioner pada minggu keenam. Pada waktu tersebut aktivitas sintesis artemisinin mulai meningkat dan laju pembelahan sel mencapai titik tertinggi, sehingga mempengaruhi kandungan artemisinin pada kalus. Jika dilihat dari grafik pertumbuhan kalus *A. annua* pada perlakuan $B_{0.5}N_{0.5}$ dan $B_{0.1}N$, kurva menunjukkan laju pertumbuhan masih meningkat pada minggu keenam. Diperkirakan fase stasioner baru terjadi pada minggu kedelapan sedangkan pada perlakuan yang lainnya dilihat dari kurva pertumbuhan kalus pada minggu keenam sudah memasuki fase stasioner.

Warna kalus yang masih menunjukkan warna kekuningan menunjukkan bahwa kalus tersebut masih aktif berdiferensiasi, kalus tersebut diduga juga mengandung klorofil dan menunjukkan adanya trikoma glandular yang merupakan tempat terakumulasinya artemisinin, sehingga pada fase akhir eksponensial masih dimungkinkan terjadinya aktivitas sintesis artemisinin. Jika sebaliknya terjadi perubahan warna kalus menjadi *kecoklatan/browning*, kemungkinan besar pertumbuhan dan perkembangan kalus tersebut telah memasuki fase stasioner (penuaan) sehingga menyebabkan produksi metabolit sekunder menurun.

Setelah dilakukan penimbangan bobot basah kalus pada minggu keenam kemudian kalus dipanen dan dikeringkan untuk dapat diketahui bobot keringnya. Bobot kering kalus tertinggi diperoleh dari perlakuan $B_{0.5}N_{0.5}$ yaitu sebesar 0,2166 gram dengan persentase kadar air sebesar 74,35% dari bobot basah kalus dengan kandungan artemisinin sebesar 0,73% dan bobot total artemisinin 1,58%. Kandungan air pada kalus akan menentukan bobot kering kalus yang dihasilkan dan kandungan artemisinin total dengan faktor bobot kering. Bobot basah yang tinggi belum tentu mencerminkan adanya pembentukan sel-sel yang lebih baik atau penyimpanan hasil sintesis yang rendah

karena didominasi oleh kandungan air yang tinggi. Pertumbuhan yang baik mencerminkan adanya bobot kering yang tinggi karena penyerapan unsur hara dan zat pengatur tumbuh digunakan untuk membentuk sel-sel baru.

Hasil penelitian Zia *et al.* (2007) pada kultur kalus *A. absinthium* menunjukkan bahwa penggunaan media MS + BAP 2 mg/l dan NAA 2 mg/l dapat menghasilkan artemisinin sebesar 0,03%. Selanjutnya Keng *et al.* (2010) menyatakan bahwa penggunaan formulasi media MS + BAP 0,35 mg/l + IAA 0,25 mg/l dapat menginduksi pembentukan artemisinin sebesar 0,08%.

KESBVDPULAN

Metode kultur kalus dengan menggunakan eksplan daun *Artemisia annua* L. dapat menghasilkan artemisinin. Formulasi media terbaik untuk induksi kalus adalah MS dengan penambahan BAP 0,5 mg/l dan NAA 0,5 mg/l, dengan bobot basah kalus tertinggi yaitu 844,4 mg dengan bobot kering kalus 216,6 mg. Formulasi media tersebut menghasilkan kandungan artemisinin tertinggi sebesar 0.73% dan bobot total artemisinin tertinggi dari kalus sebesar 1,58%.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih disampaikan kepada Misky Asrina yang telah membantu pelaksanaan kegiatan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Baldi A and VK Dixit. 2008.** Enhanced artemisinin production by cell cultures of *Artemisia annua*. *Current Trends in Biology and Pharmacy* 2(2), 341-348.
- Benjamin BD, AT Siphimalani and MR Heble. 1991.** Tissue culture of *Artemisia pallens*: organogenesis, terpenoid production. *Cell, Tissue and Organ Culture* 21, 159-164.
- Bhojwani SS and MK Razdan. 1996.** *Plant Tissue Culture: Theory and Practice*, a Revised Edition. Department of Botany. Delhi. India..
- Butler D. 1997.** Time to put malarial control on the global agenda. *Nature* 386, 535-541.
- Charles DJ, JE Simon, KV Wood and P Heinstein. 1990.** Oerplasm variation in artemisinin content of *Artemisia annua* L. using an alternative method of artemisinin analysis from crude plant extract. *Journal of Natural Products* 53, 157-160.
- Delabays N, X Simonnet, M Gaudin. 2001.** The genetics of artemisinin content in *Artemisia annua* L. and the breeding of high yielding cultivars. *Current Medical Chemistry* 8, 1795-1801.
- Ernawati A. 1992.** Produksi senyawa-senyawa metabolit sekunder dengan kultur jaringan tanaman hal 169-208. **Dalam:** Bioteknologi Tanaman I. GA Wattimena, PAU Bioteknologi IPB. Bogor.
- George EF and PD Sherrington. 1994.** *Plant Propagation by Tissue Culture*. Exegetics Limited. England.
- Gunawan LV. 1987.** *Teknik Kultur Jaringan Tumbuhan*, 167-179. Laboratorium Kultur Jaringan Institut Pertanian Bogor..
- Keng CL, N Singaram and BP Lim. 2010.** Production of artemisinin from cell suspension culture of *Artemisia annua* L. *Molecular Biology and Biotechnology* 18(1), 139-141.
- Nin SE, Morosi, S Schiff and ABennici 1996.** Callus culture of *Artemisia absinthium* L. initiation, growth optimization and organogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 45, 67-72.
- Simon JE, D Charles, E Cebert, L Grant, J Janick and A Whipkey. 1990.** *Artemisia annua* L.: Promising aromatic and medicinal, p. 522-526. **In:** J Janick and JE. Simon (Eds.). *Advances in New Crops*. Timber press, Portland, OR.
- WHO. 2004.** More than 600 million people need effective malaria treatment to prevent unacceptably high death rates. *Press release WHO/29*, 22 April.
- Zia M, RRehman and MF Chaudhary. 2007.** Hormonal regulation for callogenesis and organogenesis of *Artemisia absinthium* L. *African Journal of Biotechnology* 6(16), 1874-1878.