

7. STUDI PEMBENTUKAN KULTUR KALUS *Camellia sinensis* L. DAN DETEKSI KANDUNGAN EPIGALLOCATECHIN GALLATE- NYA

by Sutini Sutini

Submission date: 09-Feb-2022 10:34AM (UTC+0700)

Submission ID: 1758215615

File name: 7_JBR_2009.pdf (1.23M)

Word count: 1907

Character count: 10924

STUDI PEMBENTUKAN KULTUR KALUS *Camellia sinensis* L. DAN DETEKSI KANDUNGAN EPIGALLOCATECHIN GALLATE-NYA

Sutini¹, Tatik W², Wahyu W³, dan S.B. Sumitro⁴

¹ Jurusan Agronomi FP UPN 'Veteran' Jatim Surabaya

E-mail: tien_basuki@yahoo.com

² Jurusan Agronomi FP Universitas Brawijaya Malang

³ Jurusan Biologi FMIPA Universitas Brawijaya Malang

⁴ Jurusan Biologi FMIPA Universitas Brawijaya Malang

ABSTRACT

Epigallocatechin gallate (EGCG) bioactive was found in tea plant (Camellia sinensis L). Problems to obtain EGCG from plants are: seasonal high dependence, large land necessity, need for intensive maintenance, and relatively low production. That was why tea callus culture formation study by using in vitro technique had to be developed to solve problems above. This technique was very effective to control formation of callus culture and did not need a large land. The research was aimed to study the influence of growth hormones (sitokinin and auksin) toward the growth of tea callus which was potential to inhibit adipocytes and apoptosis induction; and to detect EGCG in the callus formed. Methods: (1) tea shoot growing for explant (2) choosing growth hormone in various concentration (3) inducing tea callus in vitro by tea leaves/cotiledon explants on MS medium-growth hormone choosen enrichment (4) subculture on fresh medium (5) callus extraction (6) measurement of tea leaves's EGCG level by HPLC. Results: tea leaves's explant could be grown into callus by kinetin: 2-4 D (1 ppm concentration) and HPLC measurement showed that callus EGCG level was 0.92%.

Key words: *Epigallocatechin gallate, callus culture, Camellia sinensis L.*

PENGANTAR

Bioaktif *epigallocatechin gallate* (EGCG) terdapat pada tanaman teh (*Camellia sinensis* L). Multikasiat bioaktif EGCG diantaranya sebagai: anti kanker, antidiabetes, antikolesterol, antibakteri, anti penyakit jantung dan anti osteoporosis. Berbagai fungsi teh pada industri diantaranya untuk: minuman, kosmetik, farmasi, makanan (Hartoyo, 2003). Selama ini pembudidayaan tanaman teh masih banyak dilakukan di lahan, dengan kendala: dipengaruhi musim, temperatur 24.4° C (Williges, 2004), kadar senyawa yang relatif rendah sekitar ± 1% (Ruan, 2005) makin sempitnya lahan yang tersedia, memerlukan pemeliharaan intensif seperti penyiangan, pemangkasan, pemberantasan gulma, pemberantasan hama-penyakit (Setiti, 2000). Oleh karena itu produksi EGCG perlu dikembangkan dengan teknik kultur *in vitro*.

Teknik ini mempunyai keuntungan dibandingkan dengan tanaman utuh karena kecepatan pertumbuhan sel dan biosintesis dalam kultur yang diinisiasi dari eksplan sangat tinggi dan dalam periode yang sangat singkat. Beberapa keuntungan dari pemakaian teknik kultur *in vitro* untuk produksi EGCG: tidak tergantung musim, sistem produksi dapat diatur sesuai kebutuhan, lebih konsisten, dan mengurangi penggunaan lahan (Watimena, 1992). Kultur *in vitro* juga lebih ekonomis untuk tanaman yang memerlukan waktu lama untuk mencapai usia produktif.

Dalam kultur *in vitro* jaringan tanaman dapat dikulturkan pada media cair atau media padat yang dapat membentuk kalus. Kalus adalah massa amorf yang tersusun atas sel-sel parenkim berdinding sel tipis yang berkembang dari hasil proliferasi sel-sel jaringan induk. Kalus dihasilkan dari lapisan luar sel-sel kortek pada eksplan melalui pembelahan sel berulang-ulang. Tahap pembentukan kalus menurut Yuwono (2006) ada 3 tahap: (1) induksi (2) pembelahan sel dan (3) diferensiasi sel. Pada tahap pembentukan kalus ini salah satu faktor yang mempengaruhinya adalah zat pengatur tumbuh/ZPT, misalnya pada pertumbuhan kalus *Camellia sinensis* varietas yabukita pertumbuhan optimal dicapai pada ZPT IBA 4 ppm dan BAP 2 ppm (Mondal 2004). Kombinasi ZPT auksin dan sitokinin yang optimal ternyata dapat memacu pertumbuhan dan produksi metabolit EGCG dalam kalus.

Penelitian ini bertujuan untuk: (1) Mengkaji pengaruh zat pengatur tumbuh sitokinin dan auksin terhadap pertumbuhan kalus *Camellia sinensis* L. (2) Mendeteksi kemungkinan adanya EGCG yang terbentuk.

BAHAN DAN CARA KERJA

Pertama optimasi penumbuhan biji teh yang diambil dari kebun Wonosari Lawang, untuk eksplan. Menurut Welter, L.R., dkk., 1991, optimasi penumbuhan biji teh dilakukan sebagai berikut: a) biji teh dihilangkan kulitnya

untuk mengurangi dormansi, b) biji dipindahkan kedalam botol yang berisi etanol diletakkan di pengocok selama 2 menit. c) Etanol dikeluarkan lalu ditambahkan Na-hypoklorit, diletakkan di pengocok selama 2 menit. d) Biji yang terapung dibuang, jika biji masih kotor perlu dicuci ulang dengan hypoklorit. e) Dibilas dengan akuades steril. f) Ditempatkan di atas kertas saring yang telah disterilkan, lalu ditanam ke dalam medium agar dalam botol, masing-masing botol diisi 4–5 biji diperam selama 4–8 minggu. g) Setelah tumbuh menjadi kecambah, setiap bagian organ kecambah dapat dijadikan untuk eksplan.

Kedua pemilihan eksplan kecambah teh kegiatannya sebagai berikut: (a) eksplan diambil dari kecambah teh umur 7 hari dibersihkan dari media agar. (b) Kecambah disterilisasi. (c) Kecambah steril dipotong bagian pucuk daun, hipokotil, epikotil, kotiledon dan akar sebagai eksplan, kemudian ditanam pada media kultur.

Ketiga optimasi induksi kalus teh dengan medium MS ditambah ZPT dengan variasi konsentrasi: NAA:k masing-masing 0,5 ppm, 2,4-D:k masing-masing 1 ppm, NAA:2IP masing-masing 0,5 ppm dan 2,4-D:BAP masing-masing 0,5:1 ppm. Eksplan yang digunakan kecambah dan pucuk daun teh.

Keempat induksi kalus teh dengan eksplan pucuk daun menggunakan ZPT hasil optimasi yaitu 2,4-D: k masing-masing 1ppm. Disamping itu juga dilakukan pemilihan eksplan pucuk daun sebagai berikut: (a) eksplan dipetik dari pucuk daun teh posisi 1, 2 dan 3 (Simanjuntak, 2004) dari kebun dicuci dengan air yang mengalir sampai bersih, lalu direndam dalam larutan banlate 5%, (b) eksplan disterilisasi seperti prosedur sterilisasi biji. (c) Daun steril dipindahkan pada cawan petri, dipotong-potong ukuran 0,5–1 cm, ditanam sebanyak 4–5 eksplan. (d) Diinkubasi dengan pencahayaan 1100 lux pada temperatur 25° C dan diamati kemampuannya untuk membentuk kalus selanjutnya disubkultur.

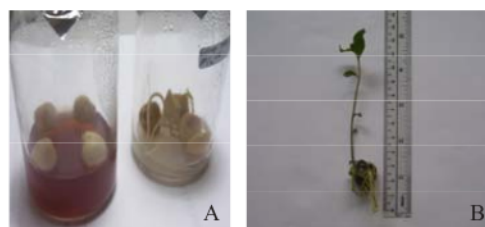
Subkultur/diperbanyak dengan cara kalus dipotong menjadi 4–5 bagian dipindahkan pada media baru secara aseptis di LAF lalu diinkubasi dalam ruang kultur pada temperatur 25° C selama 4 minggu dengan pencahayaan. Kalus yang disubkultur dipilih bagian yang berwarna putih kehijauan karena pada bagian tersebut sel-selnya masih aktif mengalami pembelahan.

Kelima analisis EGCG menggunakan HPLC, dengan tahapan: (a) pembuatan larutan standar EGCG (dibeli dari Sigma), (b) perhitungan linieritas standar EGCG,

(c) ekstraksi kalus dan daun kemudian diadisi dengan standar 15 ppm. (d) menyuntikkan sampel kalus dan daun yang telah diekstraksi ke dalam HPLC, Area yang didapat diinterpolasi kedalam kurva standar sehingga diperoleh kadar EGCG. Sebelum analisis kandungan EGCG, kalus ditiriskan sebagian diamati secara mikroskopis.

HASIL

1. Penumbuhan kecambah biji teh untuk eksplan
Penumbuhan biji teh menghasilkan kecambah sekitar 5%, dalam waktu \pm 6 hingga 8 minggu (Gambar 1).



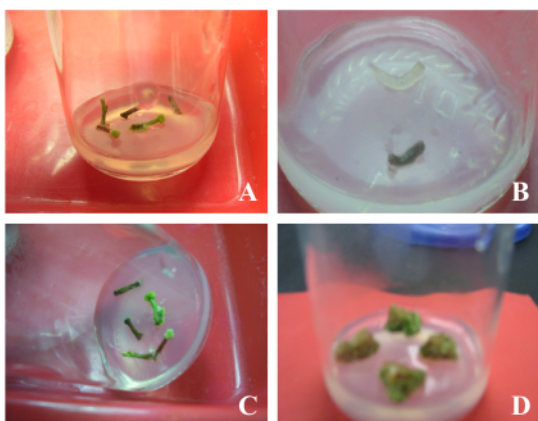
Gambar 1. Penumbuhan kecambah biji teh untuk eksplan. (A) biji dikupas kulit kerasnya, kemudian kotiledon pecah membentuk akar, (B) biji umur 8 minggu (Bar = 5 mm).

Tabel 1. Respons Pertumbuhan beberapa eksplan kecambah dan pucuk daun teh dengan medium induksi kalus

Eksplan	Respons Minggu ke			
	1	2	3	4
Kotiledon dilukai	Hijau Kekuningan	–	Kalus ø 0.1 m	Membusuk
Epikotil dilukai	Hijau Kekuningan	+	Kalus ø 0.2 cm	Kalus ø 0.5 cm
Akar dilukai	Hijau Kecoklatan	–	Kalus ø 0.1 cm	Membusuk
Hipokotil dilukai	Hijau	+	Kalus ø 0.2 cm	Kalus ø 0.1 cm
Pucuk daun	Cembung	+	Kalus ø 0.5 cm	Kalus ø 1 cm

2. Induksi kalus teh dengan medium MS ditambah variasi ZPT. Respons pertumbuhan kalus dari variasi konsentrasi ZPT terdapat pada Tabel 1, (Gambar 2) dan Tabel 2, (Gambar 3)

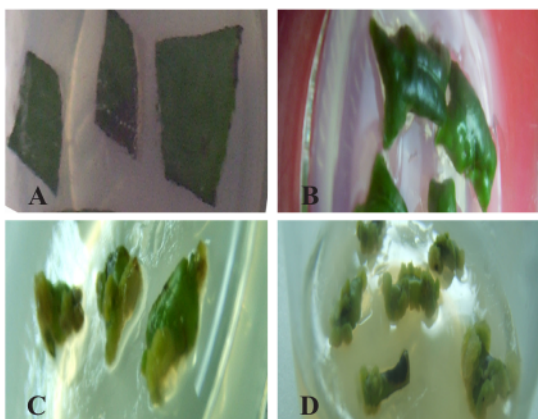
Pertumbuhan kalus teh lainnya pada proses optimasi ini rendah, bentuknya keras-padat. Kultur cenderung jadi coklat menua/terkait dengan kerusakannya.



Gambar 2. Pertumbuhan eksplan kecambah. (A) epikotil, (B) akar, (C) hipokotil (D) kotiledon, (Bar = 5 mm).

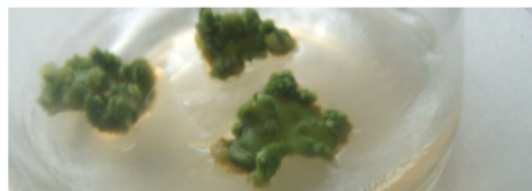
Tabel 2. Pertumbuhan kalus eksplan pucuk daun dengan variasi konsentrasi ZPT

ZPT (ppm)	Respon Minggu ke			
	1	2	3	4
NAA:K (0.5:0.5)	Hijau pucat	-	Ø kalus 0.1 cm	Membusuk
2,4-D:K (1:1)	menggembung	+	Ø kalus 0.5 cm	Ø kalus 1 cm
NAA:2 IP (0.5:0.5)	Hijau pucat	-	Kecoklatan	Mengering
2,4-D:BAP (0.5:1)	menggembung	+	Ø kalus 0.5 cm	Ø kalus 0,5 cm



Gambar 3. Respons pertumbuhan kalus. eksplan pucuk daun 0 minggu (A) eksplan pucuk daun 2 minggu hijau menggembung (B), eksplan pucuk daun 3 minggu kalus ada pada luka tepi (C), eksplan pucuk daun 4 minggu Ø kalus 1 cm (D). (Bar = 5 mm).

Pada umur empat minggu setelah induksi, kalus terbentuk pada bagian tepi yang dipotong kemudian melebar sampai seluruh permukaan eksplan (Gambar 4).



Gambar 4. Induksi kalus teh umur empat minggu (Bar = 5 mm).

3. Subkultur

Hasil subkultur pertama, pada umur empat minggu setelah masa tanam, diameter kalus meningkat menjadi ± 1 cm (Gambar 5).



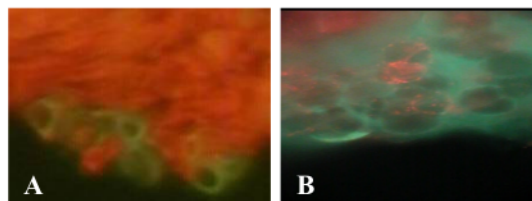
Gambar 5. Kalus subkultur (Bar = 5 mm).

4. Pemanenan kultur kalus

Setelah kultur ditanam pada umur 4 minggu dari masa tanam, dipanen dengan cara mengeluarkan dari botol, ditiriskan di tisu kemudian ditimbang, didapat bobot basah dan setelah pengeringan didapat bobot kering.

5. Pengamatan mikroskopis

Pengamatan secara mikroskopis menggunakan mikroskop fluoresen dengan perbesaran $400 \times$ tampak bahwa ada perubahan jumlah dalam sel kultur dibandingkan dengan pada pucuk daun muda (Gambar 6).



Gambar 6. Dengan mikroskop fluoresen perbesaran $400 \times$: (A) bentuk sel pucuk daun, (B) Bentuk sel kultur kalus tampak lebih besar (Bar = 5 mm).

6. Analisis EGCG dengan HPLC

Analisis EGCG dengan HPLC kadar daun sebesar 0,91%, sedangkan kadar kalus sebesar 0,92%.

PEMBAHASAN

Kalus *Camellia sinensis* L mengandung EGCG pada kultur in vitro, hal ini menunjukkan bahwa kultur mempunyai prospek untuk dikembangkan menjadi sebuah teknologi produksi EGCG.

Menurut Mondal (2004), prosedur penumbuhan kalus dengan metode ini dapat dilakukan, kenyataannya dengan variasi konsentrasi ZPT pada umur 4 minggu hanya 2,4-D:K dengan konsentrasi 1 ppm yang pertumbuhannya meningkat. Respons pertumbuhan kalus teh lainnya pada proses optimasi ini rendah, bentuknya keras-padat. Kultur cenderung jadi coklat menua/terkait dengan kerusakannya.

Perbanyak kalus pada media baru disebut subkultur. Subkultur dilakukan karena medium yang lama nutrisinya sudah habis dipakai untuk metabolisme.

Pada Gambar 6 diameter sel pucuk daun \pm 5 mm, diameter sel kalus sebagian membesar mencapai \pm 6–10 mm. Perbesaran sel ini terkait dengan penggunaan medium MS dan penambahan ZPT kinetin yang menyebabkan pembelahan sel dan 2-4 D membuat elastisitas dinding sel. Relevan dengan penelitian Purwanto (1987) ZPT kinetin 2 ppm dan 2,4-D 0,5 ppm pada kultur *Solanum indicum* L., dapat memacu pertumbuhan & produksi metabolit sekunder dalam kalus.

Analisis EGCG dengan HPLC, diperoleh kadar hampir sama antara daun dan kalus. Kadar EGCG dalam kalus ini dapat ditingkatkan dengan penambahan elisitor logam (Sutini, 2008).

KEPUSTAKAAN

- Hartoyo Arif, 2003. Teh dan kasiatnya bagi kesehatan. Sebuah tinjauan ilmiah, Kanisius. Yogyakarta.
- Mondal TK, dkk, 2004. Recent advances of tea (*Camellia sinensis*) biotechnology, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 76: 195–254.
- Purwanto Setyo, 1987. Studi pembentukan kultur kalus *solanum indicum* l. Dan deteksi kandungan steroidnya. Skripsi Fakultas Farmasi Unair. Surabaya.
- Setiti Edy WU, 2000. Prospek Aplikasi Teknik Kultur Jaringan Dalam Agrobisnis, Prosiding Seminar Nasional, Prospek Agrobisnis Menyongsong Otonomi Daerah. Fakultas MIPA Unair Surabaya, p. 29–33.
- Simanjuntak T, 2004. Pemanfaatan Pengetahuan Bioteknologi pada Teh hijau, Cakrawala Medan.
- Sutini 2008. Meningkatkan produksi flavan-3-ol melalui kalus *camellia sinensis* l: dengan elisitor Cu²⁺. *J. Biological research*. 14(1): 29–39.
- Watimena GA, 1992. Bioteknologi tanaman, Pusat antar Universitas. IPB Bogor.
- Welter LR dkk., 1991. Plant tissue culture metode. Section Prairie Regional Laboratory Saskatcon, Sakachewan, Canada. Eddisi Kedua. Widiyanto B.
- Williges U, 2004. Status of organic agriculture in Sri Lanka with special emphasis on tea production systems (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze), Dissertation, Faculty of Plant Production, Justus-Liebig-University of Giessen. p. 4. <http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2005/2315/pdf/WilligesUte-2005-02-10.pdf>. *J. Biotechnology* 2(10): 1214–1234.
- Yuwono T, 2006. Bioteknologi Pertanian. Gajah Mada University Press. Hal. 169.

7. STUDI PEMBENTUKAN KULTUR KALUS *Camellia sinensis* L. DAN DETEKSI KANDUNGAN EPIGALLOCATECHIN GALLATE-NYA

ORIGINALITY REPORT

1 %	%	%	1 %
SIMILARITY INDEX	INTERNET SOURCES	PUBLICATIONS	STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1	Submitted to University of Nottingham	1 %
	Student Paper	

Exclude quotes Off

Exclude matches Off

Exclude bibliography Off