

# Pengaruh pemberian elisitor $\text{Cu}^{2+}$ terhadap kalus *Artemisia vulgaris* dalam upaya penyediaan artemisinin sebagai antimalaria

## The effect of $\text{Cu}^{2+}$ as an elicitor to *Artemisia vulgaris* callus in the provision of artemisinin as antimalarial

RAUDHATUL JANNAH<sup>✉</sup>, SUWIRMEN, ZOZY ANELOI NOLI

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Andalas, Kampus Unand Limau Manis, Padang 25163, Sumatera Barat, PO BOX 143. Tel.: +62-751-71671, Fax.: +62-751-73118, ✉email: raudhatulana@gmail.com

Manuskrip diterima: 25 April 2016. Revisi disetujui: 7 Desember 2016.

**Abstrak.** Jannah R, Suwirmen, Noli ZA. 2016. Pengaruh pemberian elisitor  $\text{Cu}^{2+}$  terhadap kalus *Artemisia vulgaris* dalam upaya penyediaan artemisinin sebagai antimalaria. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon 2: 155-158*. Penelitian tentang pengaruh pemberian elisitor  $\text{Cu}^{2+}$  terhadap kalus *Artemisia vulgaris* L. dalam upaya penyediaan artemisinin sebagai antimalaria telah dilaksanakan pada bulan Agustus 2015 hingga Februari 2016 di Laboratorium Kultur Jaringan dan Laboratorium Riset Fisiologi Tumbuhan, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam serta Laboratorium Kimia Organik Bahan Alam, Fakultas Farmasi, Universitas Andalas, Padang. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh beberapa konsentrasi elisitor  $\text{Cu}^{2+}$  pada media MS yang dapat meningkatkan kadar artemisinin pada kalus *Artemisia vulgaris* L. Penelitian ini menggunakan metode eksperimen berupa Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 5 perlakuan dan 5 ulangan. Terdapat 5 taraf perlakuan pemberian  $\text{Cu}^{2+}$  (0 ppm; 2,5 ppm; 5 ppm; 7,5 ppm; dan 10 ppm). Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar artemisinin tertinggi adalah 0,00790% pada penambahan 7,5 ppm  $\text{Cu}^{2+}$ .

**Kata kunci:** *Artemisia vulgaris*, artemisinin,  $\text{Cu}^{2+}$ , elisitor, kalus

**Abstract.** Jannah R, Suwirmen, Noli ZA. 2016. The effect of  $\text{Cu}^{2+}$  as an elicitor to *Artemisia vulgaris* callus in the provision of artemisinin as antimalarial. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon 2: 155-158*. The research of the effect of  $\text{Cu}^{2+}$  as an elicitor to *Artemisia vulgaris* callus in the provision of artemisinin as antimalarial had been done in August 2015 until February 2016 at Plant Physiology and Tissue Culture Laboratory, Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences and the Organic Chemistry Laboratory of Nature Materials, Faculty of Pharmacy, University of Andalas, Padang. The aim of the research was to find the best concentration of  $\text{Cu}^{2+}$  as elicitor to increase artemisinin production of callus *Artemisia vulgaris* L. on MS medium. The research used a Completely Randomized Design (CRD) with 5 treatments and 5 replications. The treatments consisted of 0 ppm, 2.5 ppm, 5 ppm, 7.5 ppm and 10 ppm of  $\text{Cu}^{2+}$ . The results showed that the highest content of artemisinin was 0.00790% with the addition of 7.5 ppm  $\text{Cu}^{2+}$ .

**Keywords:** *Artemisia vulgaris*, artemisinin, callus,  $\text{Cu}^{2+}$ , elicitor

### PENDAHULUAN

Malaria merupakan salah satu penyakit yang banyak dijumpai di negara tropis, termasuk Indonesia. Masalah pengobatan malaria hingga kini belum tuntas karena meluasnya populasi parasit *Plasmodium* yang resistan terhadap obat antimalaria kuinin dan turunannya seperti klorokuin, sulfadoksin, primetamin, kina, amodiakuin, meflokuin, dan halofantrin. Untuk itu, penemuan obat antimalaria baru yang lebih efektif mengatasi *Plasmodium* yang resistan terhadap obat antimalaria turunan kuinin sangat dibutuhkan (Tjitra 1994). Terdapat jenis tanaman alternatif yang mengandung senyawa antimalaria yaitu *Artemisia annua* L. yang tumbuh subur di Cina. Tanaman ini mengandung bahan aktif artemisinin yang sangat efektif mengatasi penyakit malaria yang resistan terhadap kina (kuinin) dan derivatnya (Ebadi 2007). Hingga saat ini, *A. annua* merupakan satu-satunya jenis tanaman yang

mengandung artemisinin dengan kadar yang cukup tinggi di alam, bervariasi antara 0,1-1,8% (Ferreira et al. 2005). Namun, *A. annua* merupakan tanaman subtropis yang berasal dari Cina kemudian menyebar ke Vietnam dan Malaysia (Kardian 2006). Meskipun demikian, terdapat jenis *Artemisia* lain yang tumbuh di Indonesia. Salah satunya adalah *Artemisia vulgaris* L. yang tersebar hampir di seluruh dataran tinggi di Indonesia, namun paling banyak ditemukan di Papua (Widyastuti 2011).

*Artemisia vulgaris* merupakan salah satu jenis *Artemisia* yang tumbuh subur di Indonesia disamping *A. cina* dan *A. sacrorum*. Meskipun demikian, kajian mengenai *A. vulgaris* belum banyak dilakukan. Mannan et al. (2010) melaporkan bahwa artemisinin yang terkandung dalam *A. vulgaris* sekitar 0,06% dari berat kering pada bagian daun dan 0,05% pada bagian bunga.

Saat ini, Indonesia memperoleh bahan baku artemisinin dari luar negeri dan harganya relatif mahal. Menurut

Widyastuti (2011), *A. vulgaris* berpotensi sebagai sumber artemisinin lokal karena tumbuh secara alami di Indonesia. Akan tetapi, *A. vulgaris* memiliki kadar artemisinin yang rendah. Oleh karena itu, produksi metabolit sekunder artemisinin perlu ditingkatkan diantaranya melalui teknik kultur jaringan (in vitro) seperti kultur kalus. Namun, pada umumnya kadar metabolit sekunder yang dihasilkan melalui teknik kultur jaringan relatif rendah. Menurut Mantell dan Smith (1983), agar produksi metabolit sekunder tinggi maka perlu optimasi faktor-faktor internal dan eksternal tanaman. Pemberian elisitor merupakan salah satu faktor eksternal yang dapat digunakan untuk meningkatkan metabolit sekunder tanaman (Mukarlina et al. 2006).

Salah satu jenis elisitor yang umum digunakan untuk meningkatkan metabolit sekunder adalah ion logam  $\text{Cu}^{2+}$ . Ion tembaga ( $\text{Cu}^{2+}$ ) merupakan mikronutrien esensial bagi seluruh makhluk hidup yang berperan penting dalam transpor elektron, reaksi reduksi-oksidasi (redoks), dan berbagai jalur metabolisme (Marschner 1995). Muryanti dan Anggarwulan (2005) menyatakan bahwa ion  $\text{Cu}^{2+}$  berperan dalam respons pertahanan pada tanaman dengan merangsang gen tertentu dan meningkatkan pembentukan jalur metabolit sekunder.

Terdapat banyak kajian mengenai penggunaan  $\text{Cu}^{2+}$  yang telah berhasil meningkatkan metabolit sekunder tanaman, beberapa diantaranya adalah dapat meningkatkan kadar *flavan-3-ol* pada kalus *Camelia sinensis* (Sutini et al. 2008), serta senyawa stigmasterol dan sitosterol pada kalus purwoceng *Pimpinella alpine* (Savitri dan Nawafila 2013). Selain itu, elisitor  $\text{Cu}^{2+}$  juga mampu meningkatkan kandungan triterpenoid pada kalus pegagan *Centella asiatica* (Oktafiana 2010).

Badan kesehatan dunia (WHO 2010), merekomendasikan penggunaan *Artemisinin Combination Therapy* (ACT) untuk pengobatan penyakit malaria yang resisten, sehingga penyediaan bahan baku artemisinin sangat dibutuhkan. Oleh karena itu, dilakukan penelitian dengan tujuan untuk menentukan konsentrasi elisitor  $\text{Cu}^{2+}$  pada media MS yang dapat meningkatkan kadar artemisinin pada kalus *Artemisia vulgaris* L.

## BAHAN DAN METODE

Penelitian ini menggunakan metode eksperimen yang disusun dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 5 ulangan dan 5 perlakuan. Perlakuan terdiri atas 0 ppm (kontrol), 2,5 ppm, 5 ppm, 7,5 ppm, dan 10 ppm  $\text{Cu}^{2+}$ .

Kalus *A. vulgaris* berasal dari eksplan daun yang diinduksi dengan menggunakan medium MS yang ditambah dengan 0,5 ppm BAP dan 1 ppm 2,4-D. Kalus berumur 90 hari disubkultur ke dalam medium perlakuan elisitor  $\text{Cu}^{2+}$  dengan menggunakan pinset steril di dalam *Laminar Air Flow Cabinet*. Botol-botol kultur yang berisi kalus *A. vulgaris* dari media inisiasi diinkubasi di ruang inkubasi dengan suhu 20-23°C. Untuk mencegah kontaminasi dilakukan penyemprotan pada botol kultur dengan alkohol 70% setiap hari dengan menggunakan *handsprayer*. Kalus hasil perlakuan elisitor, diuji kadar artemisininnya pada hari ke-28 setelah penambahan

elisitor. Pengujian kadar artemisinin dilakukan dengan menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT).

Analisis data dilakukan secara statistik terhadap parameter berat basah dan berat kering kalus. Apabila pengaruh perlakuan berbeda nyata maka dilanjutkan dengan uji lanjut *Duncan New Multiple Range Test* (DNMRT) pada taraf 5%.

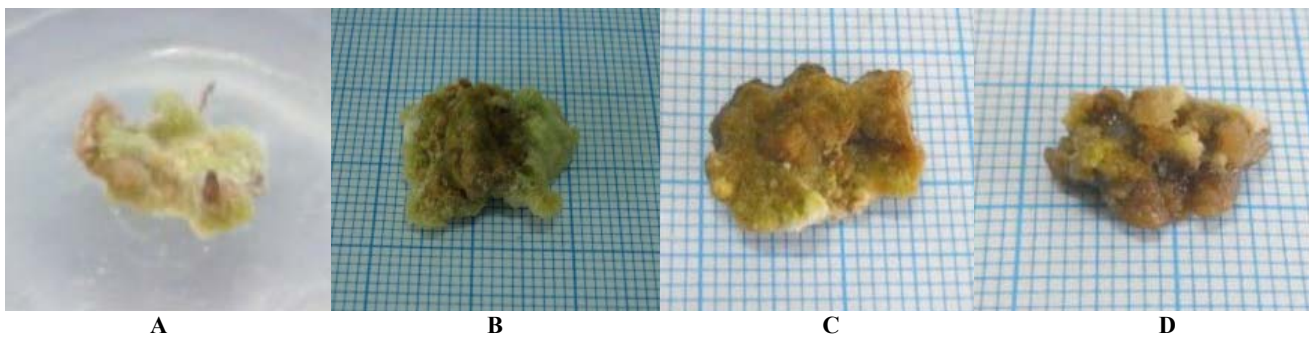
## HASIL DAN PEMBAHASAN

Persentase hidup kalus *A. vulgaris* pada semua perlakuan adalah 100%. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian elisitor  $\text{Cu}^{2+}$  dengan berbagai konsentrasi pada medium perlakuan masih dapat ditoleransi oleh kalus, sehingga kalus masih dapat tumbuh dan bertahan terhadap perlakuan yang diberikan. Dengan demikian, penggunaan elisitor  $\text{Cu}^{2+}$  pada kisaran 2,5-10 ppm belum bersifat toksik bagi kalus, sehingga kalus masih dapat bertahan hidup. Menurut Rosmarkam dan Yuwono (2002), tingkat toksisitas Cu (tembaga) terhadap tanaman dipengaruhi oleh beberapa faktor, seperti jenis tanaman dan kadar Cu pada tanaman. Toksisitas Cu terjadi apabila kadar Cu dalam tanaman berkisar antara 20-30 ppm per berat kering tanaman.

Berdasarkan hasil pada Tabel 1, terlihat tekstur dan warna kalus yang dihasilkan pada medium perlakuan dengan penambahan elisitor  $\text{Cu}^{2+}$  dan kontrol (0 ppm  $\text{Cu}^{2+}$ ). Tekstur kalus yang terbentuk setelah 28 hari dalam medium perlakuan adalah kompak. Secara keseluruhan, kalus mengalami perubahan warna dari hijau keputihan atau hijau kekuningan pada awal perlakuan hingga memiliki variasi warna yang berbeda-beda setelah diberi perlakuan (Gambar 1). Warna kalus *A. vulgaris* setelah ditambahkan  $\text{Cu}^{2+}$  adalah putih, putih kehijauan (*sea green*), hijau kekuningan (*yellowish green*), hijau (*acid green*), kuning kecokelatan (*mimosa yellow*), dan cokelat (*dark brown*). Warna kalus mengalami perubahan seiring dengan pertambahan umur kalus. Selain itu, perubahan warna kalus *A. vulgaris* diduga terjadi akibat perbedaan laju pertumbuhan kalus pada medium perlakuan.

Tekstur kalus kompak tidak terlalu berbeda dengan tekstur kalus sebelum perlakuan (Gambar 2). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian elisitor  $\text{Cu}^{2+}$  tidak memberikan pengaruh terhadap tekstur kalus *A. vulgaris*. Tekstur kompak pada kalus *A. vulgaris* diduga disebabkan oleh adanya akumulasi zat pengatur tumbuh 2,4-D (asam 2,4 diklorofenoksiasetik) dan BAP (6- Benzil Amino Purin) yang ditambahkan ke dalam medium perlakuan. Kalus yang kompak dapat disebabkan oleh beberapa hal, diantaranya disebabkan oleh sel-sel yang semula membelah mengalami penurunan aktivitas proliferasi. Aktivitas ini dipengaruhi oleh auksin alami yang terdapat pada sumber eksplan (Santosa dan Nursandi 2002).

Berdasarkan hasil penelitian, kalus *A. vulgaris* yang diberi perlakuan  $\text{Cu}^{2+}$  memiliki berat basah lebih tinggi jika dibandingkan dengan kontrol. Berat basah mengindikasikan aktivitas pembelahan sel. Rahayu et al. (2003) menyatakan bahwa berat basah yang dihasilkan sangat tergantung pada kecepatan pembelahan sel, memperbanyak diri, dan dilanjutkan dengan membesarnya kalus.



**Gambar 2.** Warna dan tekstur kalus *A. vulgaris* sebelum dan sesudah diperlakukan dengan elisitor: (A) sebelum elisitasi, (B) kontrol (0 ppm  $\text{Cu}^{2+}$ ), (C) 7,5 ppm  $\text{Cu}^{2+}$ , dan (D) 10 ppm  $\text{Cu}^{2+}$ .

**Tabel 1.** Tekstur dan warna kalus *A. vulgaris* setelah 28 hari dalam medium perlakuan elisitor  $\text{Cu}^{2+}$

Elisitor $\text{Cu}^{2+}$ (ppm)	Tekstur	Warna
0	Kompak	PK, H, HK
2,5	Kompak	P, H, KK
5	Kompak	P, H, KK
7,5	Kompak	P, KK, HK
10	Kompak	P, C, HK

Keterangan: PK = putih kehijauan, P = putih, H = hijau, HK = hijau kekuningan, KK = kuning kecokelatan, C = cokelat

**Tabel 2.** Berat basah dan berat kering kalus *Artemisia vulgaris* dengan penambahan beberapa konsentrasi ion  $\text{Cu}^{2+}$  yang dihitung 28 hari setelah tanam (g)

Elisitor $\text{Cu}^{2+}$ (ppm)	Berat basah kalus (g)	Berat kering kalus (g)
0	0,9144 <sup>b</sup>	0,7388 <sup>b</sup>
2,5	0,9264 <sup>ab</sup>	0,7470 <sup>ab</sup>
5	1,0124 <sup>a</sup>	0,7682 <sup>a</sup>
7,5	0,9264 <sup>ab</sup>	0,7456 <sup>b</sup>
10	0,9492 <sup>ab</sup>	0,7510 <sup>ab</sup>

Keterangan: Angka-angka yang diikuti dengan huruf yang tidak sama, berbeda nyata pada taraf uji DNMRT 5%.

**Tabel 3.** Kadar artemisinin pada kalus *A. vulgaris* setelah 28 hari dielisitasi dalam medium perlakuan dengan penambahan  $\text{Cu}^{2+}$  dan pada daun *A. vulgaris*

Elisitor $\text{Cu}^{2+}$ (ppm)	Kadar artemisinin (%)
0	0,00469
2,5	0,00510
5	0,00542
7,5	0,00790
10	0,00677

Berdasarkan hasil pada Tabel 2, dapat diketahui bahwa penambahan  $\text{Cu}^{2+}$  pada medium perlakuan mampu

meningkatkan berat basah kalus *A. vulgaris*, dimana pada konsentrasi 2,5-10 ppm  $\text{Cu}^{2+}$  kalus memiliki berat basah yang lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa dengan pemberian  $\text{Cu}^{2+}$  pada medium perlakuan menunjukkan adanya aktivitas pembelahan sel. Hal ini berkaitan dengan peran  $\text{Cu}^{+}$  sebagai katalis dalam tubuh tumbuhan serta penyusun enzim seperti polifenol oksidase dan asam askorbat oksidase. Selain itu,  $\text{Cu}^{+}$  juga berperan sebagai penyusun plastosianin yang merupakan bagian penting dalam sistem transpor elektron pada fotosintesis. Dengan adanya Cu (tembaga), proses fotosintesis meningkat, sehingga proses pembelahan sel meningkat (Bidwel 1974; Devlin dan Withan 1983).

Berat kering kalus terbaik diperoleh pada perlakuan  $\text{Cu}^{2+}$  5 ppm. Hal ini menunjukkan bahwa penggunaan  $\text{Cu}^{2+}$  mampu meningkatkan berat kering kalus *A. vulgaris*. Hal ini diduga disebabkan Cu (tembaga) merupakan salah satu mikronutrien yang dibutuhkan tumbuhan dalam proses metabolisme dan enzimatik serta mampu mengoptimalkan penggunaan tembaga di dalam jaringan. Berdasarkan hasil penelitian yang didapatkan, penambahan  $\text{Cu}^{2+}$  mampu meningkatkan berat kering kalus *A. vulgaris* jika dibandingkan dengan kontrol.

Data pada Tabel 3 merupakan hasil analisis kuantitatif dengan menggunakan metode Normalitas Internal (Rohman 2009). Pada tabel terlihat bahwa kadar artemisinin pada kalus *A. vulgaris* tertinggi adalah 0,00790% pada penambahan 7,5 ppm  $\text{Cu}^{2+}$  dan kadar artemisinin terendah adalah pada kontrol (0 ppm  $\text{Cu}^{2+}$ ) yaitu 0,00469%. Hal ini membuktikan bahwa pemberian elisitor  $\text{Cu}^{2+}$  mampu meningkatkan kadar artemisinin pada kalus *A. vulgaris* secara in vitro.

Dari hasil penelitian, didapatkan kadar artemisinin tertinggi pada kalus *A. vulgaris* dengan penambahan 7,5 ppm  $\text{Cu}^{2+}$ . Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi 7,5 ppm merupakan konsentrasi optimum yang dapat memberikan pengaruh maksimum terhadap produksi artemisinin. Savitri dan Nawafila (2013) melaporkan bahwa penambahan  $\text{Cu}^{2+}$  40  $\mu\text{M}$  (8 ppm) mampu meningkatkan produksi stigmasterol dan sitosterol pada kalus *Pimpinella alpine* dengan kadar tertinggi dibandingkan perlakuan kontrol yaitu sebesar 1.695,620 ppm dan 3.128,739 ppm.

Dengan demikian, dari penelitian yang dilakukan diperoleh kesimpulan bahwa pada penambahan 2,5 ppm, 5 ppm, 7,5 ppm, dan 10 ppm  $\text{Cu}^{2+}$  mampu meningkatkan kadar artemisinin pada kalus *A. vulgaris* dibandingkan dengan kontrol. Kadar artemisinin terbaik adalah 0,00790% pada kalus dengan penambahan 7,5 ppm  $\text{Cu}^{2+}$ .

### UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih penulis ucapkan kepada Kepala Laboratorium Riset Fisiologi Tumbuhan, Universitas Andalas, Padang, Sumatera Barat atas fasilitas yang telah diberikan selama penelitian. Terima kasih juga disampaikan kepada Prof. Dr. Syamsuardi, Dr. Nurainas, dan Feskaharni Alamsjah.

### DAFTAR PUSTAKA

- Bidweel RGS. 1974. Plant Physiology. Macmilan Biology Series, New York.
- Devlin RM, Withan FH. 1983. Plant Physiology Fourth Edition. Cengage Learning, Inc., USA.
- Ebadi M. 2007. Pharmacodynamic Basic of Herbal Medicine. CRC Press, Boca Raton, United States of America.
- Ferreira JFS, Laughlin JC, Delabays N et al. 2005. Cultivation and genetics of *Artemisia annua* L. for increase production of the antimalarial artemisinin. Plant Genet Resour 3 (2): 206-229.
- Kardinan A. 2006. Tanaman artemisia penakluk penyakit malaria. <http://www.kompas.com/> [19 November 2014].
- Mannan A, Ibrar A, Waheed A et al. 2010. Survey of artemisinin production by diverse *Artemisia* species in Northern Pakistan. Malar J 9: 310-315.
- Mantell SH, Smith H. 1983. Cultural factor that influence secondary metabolite accumulation in plant cell and tissue cultures. In: Mantell SH, Smith H. (eds). Plant Biotechnology. Cambridge University Press, New York.
- Marschner H. 1995. Mineral nutrition of higher plants. Vol II. Academic Press, London.
- Mukarlina, Esyanti RR, Siregar AH. 2006. Pengaruh pemberian elisitor homogenat jamur *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp. terhadap kandungan ajmilisin dalam kultur akar *Catharantus roseus* (L) G. Don. Jurnal Matematika dan Sains 1 (2): 44-49.
- Muryanti S, Anggarwulan E. 2005. Pertumbuhan dan produksi reserpin kalus pule pandak (*Rauvolfia serpentina* (L) Bentham ex. Kurz) pada pemberian metil jasmonat beroperasi in vitro. Bioteknologi 2 (2): 58-66.
- Oktafiana L. 2010. Kultur Kalus Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) dengan Penambahan Ion  $\text{Cu}^{2+}$  sebagai Elisitor dan Uji Kualitatif Kandungan Campuran Triterpenoid. [Skripsi]. Universitas Andalas, Padang.
- Rahayu R, Solichatun, Anggarwulan E. 2003. Pengaruh asam 2,4-Diklorofenoksiasetat (2,4-D) terhadap pembentukan dan pertumbuhan kalus serta kandungan flavonoid kultur kalus *Acalypha indica* L. Biofarmasi 1 (1): 1-6.
- Rohman A. 2009. Kromatografi untuk analisis obat. Edisi Pertama. Graha Ilmu, Yogyakarta.
- Rosmarkam A, Yuwono NW. 2002. Ilmu Kesuburan Tanah. Penerbit Kansius, Yogyakarta.
- Santoso U, Nursandi F. 2002. Kultur jaringan tanaman. Universitas Muhammadiyah Malang Press, Malang.
- Savitri ES, Nawafila F. 2013. The effect of metal ion  $\text{Cu}^{2+}$  for development and secondary metabolites (stigmaterol and sitosterol) callus of purwoceng (*Pimpinella alpine* Molk.). Proceeding International Conference. University State Maulana Malik Ibrahim, Malang, 9 November 2013.
- Sutini B, Tatik W, Wahyu W et al. 2008. Meningkatkan produksi flavan-3-ol melalui kalus *Camelia sinensis* L. dengan elisitor  $\text{Cu}^{2+}$ . J Berk Panel Hayati 14: 39-44.
- Tjitra E. 1994. Obat-obat baru antimalaria. Cermin Dunia Kedokteran. Kompas, Jakarta.
- Widyastuti U. 2011. Keragaman genetik *Artemisia annua* L. dan *Artemisia vulgaris* L. berdasarkan *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP) dan sifat morfologi. <http://repository.ipb.ac.id/> [20 Januari 2015].
- WHO [World Health Organization]. 2010. Guidelines for the treatment of Malaria. [http:// www.indonesianpublichealth.com/](http://www.indonesianpublichealth.com/) [22 November 2014].