Hayati, Agustus 1997, hlm. 35-37
ISSN 0854-8587
Vol. 4, No. 2

Sintesis Minyak Atsiri pada Kultur Jaringan Nilam

(Synthesis of Volatile Oils in Tissue Cultures of Pogostemon cablin Benth)

PUSPA DEWI TJONDRONEGORO[1*], IKA MARISKA SUDARMA[2], DAN ZAMIRAWATI[1]

[1]*Jurusan Biologi FMIPA IPB, Jalan Raya Pajajaran, Bogor 16144*
[2]*Balitbio Tanaman Pangan, Jalan Tentara Pelajar, Bogor 16111*

Diterima 6 November 1996/Disetujui 26 Mei 1997

Pogostemon cablin **is a volatile oil plant. Tissue cultures of *P. cablin* leaves were studied on volatile oil synthesis using media with different plant growth regulators. Cultures on media with picloram or 2,4 dichlorophenoxy acid (0.1-1.0 mg/l) did not show differentiated callus. However, it did show callus differentiation as well as adventitious shoot generation on the culture media supplemented with naphthalene acetic acid or indole butyric acid (0.1-1.0 mg/l). The major component of volatile oils in *P. cablin* is patchouly alcohol. Thin layer chromatography and gas chromatography were employed to analyse the quality and quantity of patchouly alcohol from shoot and callus cultures. The results showed that the content of patchouly alcohol was very low and only detectable in differentiated callus cultures.**

PENDAHULUAN

Nilam (*Pogostemon cablin* Benth) adalah tanaman penghasil minyak atsiri yang mempunyai nilai ekspor cukup tinggi, setiap tahun Indonesia mengekspor 500-800 ton minyak nilam dengan nilai US $ 9-14 juta. Minyak nilam banyak digunakan dalam industri kosmetik (parfum) dan makanan.

Nilam adalah tanaman perdu yang sukar berbunga, perbanyakannya hanya dilakukan dengan stek. Tanaman ini banyak ditanam di daerah Aceh dan Sumatra Utara.

Patchouli alkohol adalah komponen utama minyak nilam (ada sekitar 40%) yang digunakan sebagai standar mutu minyak nilam. Komponen penting lainnya dalam minyak nilam ialah α, β dan γ *patchoulen* dan α - *buinesene* (Henderson *et al.* 1970)

Produksi minyak nilam melalui kultur jaringan sebagai pilihan lain cara produksi menarik untuk dipelajari. Beberapa laporan menyatakan bahwa kultur sel/kalus tidak memproduksi minyak atsiri, kalaupun ada biasanya tidak sama dengan komponen-komponen minyak atsiri dari tanaman utuh (Staba 1980, Lappin *et al.* 1987, Kennedy *et al.* 1993). Akan tetapi, Corduan & Reinhard (1972) melaporkan tentang kemampuan kultur kalus *Ruta graveolens* yang mensintesis minyak atsiri seperti pada akar tanaman.

Percobaan berikut ini dilakukan untuk mengetahui kemampuan kultur jaringan nilam dalam menimbun minyak atsiri.

BAHAN DAN METODE

Bahan Tanaman. Sumber eksplan berupa daun-daun muda tanaman nilam berasal dari Laboratorium Bioteknologi, Balai Penelitian Tanaman Industri.

Kultur Kalus. Kalus diinisiasi dari daun muda dan ditanam dalam media Murashige & Skoog (1962) dengan penambahan delapan gram agar-agar dan zat pengatur tumbuh auksin dan sitokinin. Ada empat macam auksin yang dipergunakan yaitu pikloram, 2,4-*dichlorophenoxy acetic acid* (2,4-D), *naphthalene acetic acid* (NAA), dan *indole butyric acid* (IBA). Masing-masing auksin yang dicoba terdiri atas empat macam konsentrasi yaitu 0.1, 0.4, 0.7, dan 0.1 mg/l. Pada setiap media ditambahkan sitokinin *benzyle amino purine* (BAP) sebanyak 0.1mg/1. Kultur diinkubasi dalam ruang dengan suhu $\pm$ 28°C dan diberi penyinaran lampu neon setara dengan 2000 lux selama 16 jam/hari.

Analisis Minyak Atsiri. Minyak atsiri diperoleh dengan cara ekstraksi. Satu gram bahan kering (kultur kalus/pucuk) diekstraksi dalam 10 ml larutan diklorometana selama 15 menit, kemudian ekstrak disaring. Filtratnya diuapkan sampai kering dalam penangas air, selanjutnya dilarutkan dalam satu mililiter toluen (Stahl 1985).

Untuk mengidentifikasikan kualitas minyak atsiri digunakan kromatografi lapis tipis dengan ketebalan adsorben gel silika 0.30 mm dan larutan pengembang campuran toluen: etil asetat (6:4). Untuk identifikasi kuantitatifnya dipergunakan kromatografi gas dengan kolom Carbowax 20 dan nitrogen sebagai gas pembawanya dengan kecepatan alir 30 ml/menit. Karena kesulitan mendapatkan standar *patchouli* alkohol yang merupakan komponen utama minyak nilam maka sebagai pembanding dipergunakan kadar *patchouli* alkohol dalam minyak atsiri yang diperoleh dari daun nilam utuh dari lapangan.

HASIL

Pertumbuhan Kalus. Dari berbagai perlakuan auksin yang dikombinasikan dengan BAP dalam waktu dua

* Penulis untuk korespondensi

minggu, respons pertumbuhan berupa kalus sudah tampak dan beberapa langsung berdiferensiasi membentuk tunas adventif.

Pada media yang ditambahi NAA dan IBA, kalus yang terbentuk berwarna kehijauan dengan struktur yang kompak dan berdiferensiasi membentuk tunas-tunas adventif, sedangkan pada media yang ditambahi pikloram dan 2,4-D kalus berwarna kecoklatan, berstruktur terpisahkan, dan tidak berdiferensiasi. Kalus pada media yang ditambahi pikloram dan media dengan 2,4-D cepat menjadi coklat dan mudah terkontaminasi. Pada media yang ditambahi 2,4-D kalus hanya tumbuh pada konsentrasi 0.1 mg/l. Pada Tabel 1 disajikan pertumbuhan bobot kalus dari semua perlakuan selama masa inkubasi enam minggu.

Minyak Nilam. Hasil analisis kultur kalus dengan kromatografi lapis tipis memperlihatkan bahwa ekstrak kalus yang berdiferensiasi (massa kalus dan tunas-tunas pucuk) dari media dengan penambahan NAA dan BAP memunculkan empat noda berwarna (merah-ungu) yang masing-masing Rf-nya sama dengan noda-noda yang dimunculkan oleh ekstrak daun nilam utuh, yaitu: noda biru muda (Rf 0.26), ungu muda (Rf 0.36), merah muda (Rf 0.52), dan ungu (Rf 0.84). Komponen apa yang mewakili noda-noda tersebut tidak diketahui karena tidak tersedia larutan standarnya. Menurut Hernani & Tangedjaya (1988) *patchouli* alkohol tergolong senyawa seskuiterpena yang memberikan noda berwarna ungu.

Ekstrak dari media yang ditambahi IBA dan BAP hanya memberikan noda ungu saja sesuai dengan noda ungu (Rf 0.84) dari ekstrak daun nilam. Sedangkan ekstrak kalus yang berasal dari media dengan Pikloram dan 2.4-D tidak menampakkan noda-noda berwarna, artinya tidak ada komponen-komponen minyak atsiri.

Analisis selanjutnya ekstrak kultur dari media dengan NAA dan kultur dari media dengan IBA hanya memunculkan satu puncak pada waktu retensi 27 menit. Puncak ini diduga *patchouli* alkohol seperti pada puncak dari ekstrak daun nilam utuh. Hernani & Tangendjaya (1988) yang menggunakan kolom sama mendapatkan puncak *patchouli* alkohol pada waktu retensi 25 menit. Perbedaan ini kemungkinan karena perbedaan dalam tekanan gas.

Kandungan *patchouli* alkohol dalam minyak nilam hasil ekstrak kultur kalus (gram bobot kering) berkisar antara 0.043-0.431%. Nilai ini sangat rendah bila dibandingkan dengan yang diperoleh dari ekstrak daun utuh, yaitu 36.28% (Tabel 2). Komponen-komponen lain yang tidak muncul dalam analisis kromatografi gas diduga karena konsentrasinya sangat kecil sehingga tidak terdeteksi.

Tabel 1. Pertumbuhan kalus pada pelbagai perlakuan zat pengatur tumbuh pada media Murashige dan Skoog selama masa inkubasi 6 minggu.

Zat pengatur tumbuh dalam media MS (mg/l) + 0.1 mg/l BAP	Bobot kering (gram)			Kalus
	2	4 Minggu	6	
NAA: 0.1	0.012	0.229	0.27	berdiferensiasi
0.4	0.034	0.103	0.257	berdiferensiasi
0.5	0.011	0.134	0.112	berdiferensiasi
1.0	0.007	0.067	0.164	berdiferensiasi
IBA: 0.1	0.013	0.14	0.175	berdiferensiasi
0.4	0.027	0.114	0.273	berdiferensiasi
0.7	0.037	0.153	0.184	berdiferensiasi
1.0	0.023	0.046	0.143	berdiferensiasi
PIC: 0.1	0.01	0.053	0.078	tidak berdiferensiasi
0.4	0.011	0.043	0.058	tidak berdiferensiasi
0.7	0.006	0.027	0.045	tidak berdiferensiasi
1.0	0.008	0.018	0.037	tidak berdiferensiasi
2,4-D: 0.1	0.006	0.022	0.023	tidak berdiferensiasi

PEMBAHASAN

Perlakuan berbagai macam auksin terhadap kultur daun nilam menghasilkan dua tipe kalus: kalus yang berdiferensiasi dan yang tidak berdiferensiasi. Hasil analisis secara kualitatif dengan kromatografi lapis tipis pada ekstrak kalus yang tidak berdiferensiasi, komponen-komponen minyak atsiri tidak ditemukan. Sedangkan pada kalus yang berdiferensiasi membentuk tunas-tunas adventif memunculkan noda-noda berwarna yang sama dengan noda-noda yang dihasilkan oleh ekstrak daun utuh (sebagai pembanding).

Absennya minyak atsiri dalam kultur kalus yang tidak berdiferensiasi menurut Lappin *et al.* (1987) kemungkinan karena terjadinya katabolisme segera setelah proses pembentukannya. Pada kultur akar *Artemisia absenthium* tingkat kedewasaan sistem akar menentukan sintesis minyak atsiri. Perbedaan umur dan tingkat kedewasaan fisiologi akar memperlihatkan perbedaan profil minyak atsiri (Kennedy *et al.* 1993).

Tampaknya kedewasaan jaringan menentukan sintesis minyak atsiri karena pada jaringan yang telah dewasa diferensiasi struktur-struktur yang khusus (kelenjar-kelenjar minyak) sudah terbentuk lebih sempurna. Menurut Croteau (1977) pada tanaman yang mengandung banyak monoterpena dan sesquiterpena biasanya dalam jaringan daunnya memiliki struktur khusus yang disebut kelenjar minyak. Dalam struktur khusus ini diduga berlangsung sintesis

Tabel 2. Persentase *pathcouli* alkohol dalam kultur jaringan nilam pada berbagai media kultur dan jaringan daun utuh berdasarkan analisis kromatografi gas.

Zat pengatur tumbuh (mg/l) dalam media kultur	*Patchouli* alkohol (% ekstrak kultur/g bobot kering)
0.1 NAA + 0.1 BAP	0.431
0.4 NAA + 0.1 BAP	0.043
0.7 NAA + 0.1 BAP	0.134
1.0 NAA + 0.1 BAP	0.137
0.4 IBA + 0.1 BAP	tidak terbaca
0.7 IBA + 0.1 BAP	0.046
1.0 IBA + 0.1 BAP	0.057
Jaringan daun utuh	36.28

minyak atsiri. Dengan menggunakan sukrosa yang mengandung karbon berlabel (^{14}C) sebagai prekursor monoterpena, Croteau (1977) membuktikan bahwa tempat utama biosintesis monoterpena pada tanaman *Majorana hortensis* ialah pada sel-sel epidermis dan kemungkinan dalam kelenjar-kelenjar minyak epidermis daun pada daun-daun muda yang kecil memiliki efisiensi biosintesis yang paling tinggi. Pada kultur kalus nilam yang berdiferensiasi, massa daun pada tunas-tunas adventif banyak sekali. Hasil pemeriksaan anatomi terhadap sediaan irisan daun tanaman dalam kultur menunjukkan di antara sel-sel epidermis terdapat kelenjar-kelenjar minyak. Pada permukaan atas jaringan epidermis daun banyak terdapat struktur trikoma dengan bentuk khusus, terdiri atas sel tangkai yang bulat dan sel-sel kepala yang memanjang, menonjol ke atas menyerupai bulu-bulu epidermis daun.

Struktur trikoma yang merupakan modifikasi sel-sel epidermis ini diduga menjadi tempat akumulasi minyak atsiri. Menurut Henderson *et al.* (1970) banyaknya kelenjar trikoma berkorelasi positif dengan konsentrasi total senyawa-senyawa seskuiterpenoid. Meskipun demikian senyawa tersebut tidak dijumpai dalam kultur kalus yang tidak berdiferensiasi. Massa kalus hanya merupakan kumpulan sel-sel yang menyerupai sel-sel parenkima dan tidak mengakumulasikan senyawa-senyawa minyak nilam.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa produksi minyak nilam dalam kultur kalus memerlukan tahapan diferensiasi lebih lanjut. Oleh karena itu perlu dibuat suatu sistem atau kondisi kultur yang lebih merangsang pembentukan sel-sel epidermis atau kelenjar-kelenjar minyak. Untuk itu diperlukan penelitian lanjutan untuk mencari kemungkinan mengembangkan suatu sistem (kultur) yang dapat mengendalikan ekspresi genetika pembentukan suatu organ atau struktur kelenjar yang menimbun minyak nilam. Salah satu caranya ialah dengan rekayasa genetika. Pendekatan tersebut sudah banyak dilakukan dalam upaya memproduksi metabolit sekunder *in vitro* (Bolton *et al.* 1986, Hamill *et al.* 1986, dan Hoekstra 1993).

DAFTAR PUSTAKA

Bolton G.W., E.W. Nester & M.P. Gordon. 1986. Plant phenolic compounds induce expression of the *Agrobacterium tumefaciens* loci needed for virulance. *Science* **232**:983-985.

Corduan, G. & E. Reinhard. 1972. Synthesis of volatile oils cultures of *Ruta graveolens. Phytochemistry* **11**:917-922.

Croteau, R. 1977. Site of monoterpene biosynthesis in *Majorana hortensis* leaves. *Plant Physiol.* **59**:19-520.

Hamill, J.D., A.J. Robin & M.J.C. Rhodes. 1986. Secondary product formation by cultures of *Beta vulgaris* and *Nicotiana rustica* transformed with *Agrobacterium rhizogenes. Plant Cell Rep.* **5**:111-114.

Henderson, W.J., J.W. Hart, P. How & J. Judge. 1970. Chemical and morphological studies on sites of seskuiterpene accumulation in *Pogostemon cablin* (patchouli). *Phytochemistry* **9**:1219-1228

Hernani & Budi Tangendjaja. 1988. Analisis mutu minyak nilam dan minyak cengkeh secara kromatografi. *Media Penelitian Sukamandi* **6**:57-65.

Hoekstra, S.S. 1993. Accumulation of Indole Alkaloide in Plant Organ Culture. Succeptibility of *Chinchona ledgeriana* to infection with *Agrobacterium rhizogenes.* Disertasi. Leiden: Rijkuniversiteit.

Kennedy, A.I., S.G. Deans, K.P. Svaboda, A.I. Gray & P.G. Waterman. 1993. Volatile oil from normal and transformed root of *Artemisia absinthium. Phytochemistry* **32**:1449-1451.

Lappin, G.J., J.D. Stride & J. Tampson. 1987. Biotransformation of monoterpenoids by suspension cultures of *Lavandula angustifolia. Phytochermistry* **26**:995-997.

Murashige, T & F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* **15**:473-496.

Staba, E.J. *1980. Plant Tissue Cultures as a Source of Biochemicals.* Boca Raton: CRC Press Inc.

Stahl, E. 1985. *Analisis secara Kromatografi dan Mikroskopi.* Bandung: Penerbit ITB.