

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Karakteristik dan Khasiat Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.)

Temulawak memiliki klasifikasi sebagai berikut: berasal dari divisi spermatophyta, kelas monocotyledonae, ordo Zingiberaceae, genus *Curcuma*, dan spesies *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. (Wardana, Nuning, Kongsjahju, Ikhbal, Khalid, dan Taryadi, 2002).

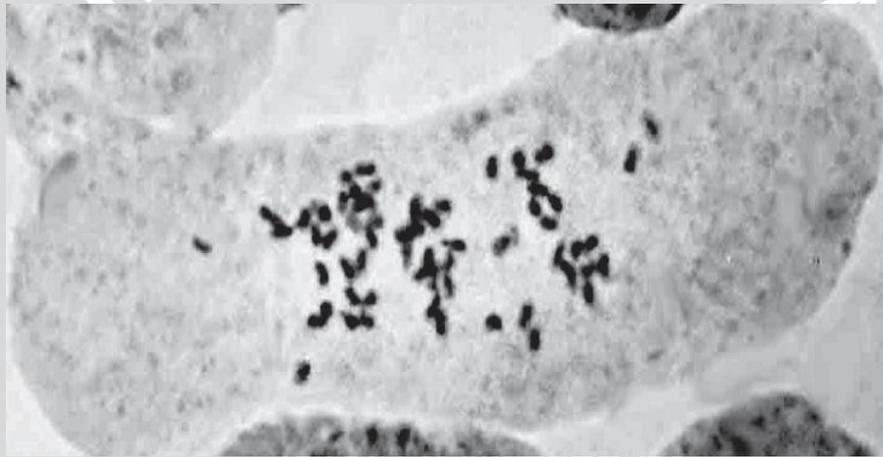
Temulawak (Gambar 1) merupakan tanaman tahunan yang memiliki batang semu berwarna hijau atau coklat gelap dengan tinggi antara 2-2,5 m. Setiap rumpun tanaman terdiri atas beberapa anakan dimana setiap anakan memiliki 2-9 daun. Daun tanaman yang tergolong dalam keluarga *Zingiberaceae* ini memiliki panjang antara 50-55 cm dengan lebar \pm 18 cm. Rimpang temulawak berbentuk bulat telur dan biasanya berbentuk agak memanjang pada bagian samping dengan jumlah sekitar 3-4 buah. Kulit rimpang yang muda maupun yang tua berwarna kuning kotor dengan warna daging kuning. Daging rimpang memiliki rasa pahit dan berbau tajam dengan keharuman sedang. Bunga temulawak berbentuk bulir bulat panjang dengan panjang 9-23 cm dan lebar 4-6 cm (Supriadi dan Hernani, 2001). Mahkota bunga temulawak memiliki warna putih hingga kuning, sedangkan warna mahkota bunga pada ujung bunga berwarna merah (Wardana *et al.*, 2002).



Gambar 1. Tanaman Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) (Rulliyah, 2016)

Menurut Syukur dan Sastrosumarjo (2015), temulawak tergolong dalam tanaman triploid ($3n$) yang memiliki 63 kromosom individu ($3n= 63$) dan 21

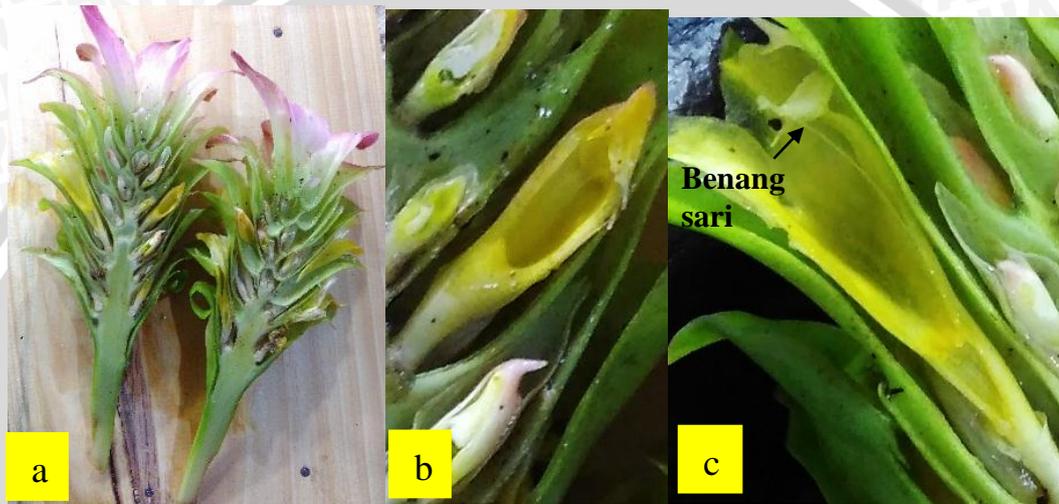
kromosom dasar. Akan tetapi data yang berkaitan dengan *karyotyping* temulawak masih belum ditemukan, karena menurut pendapat Joseph (2010) terdapat beberapa tanaman yang berasal dari kelompok Zingiberaceae yang memiliki ukuran kromosom yang kecil sehingga *karyotyping* sulit dilakukan. Oleh karena itu, sebagai pengganti gambar kromosom temulawak, dijabarkan contoh gambar metafase pada kromosom kunyit (*Curcuma longa* Linn.) (Gambar 2) yang masih tergolong dalam satu genus dengan temulawak yaitu genus *Curcuma* dan memiliki jumlah kromosom yang sama yaitu 63 kromosom individu (Ravindran, Babu, dan Sivaraman, 2007). Ravindran *et al.* (2007) menambahkan bahwa, karakteristik lain dari kromosom genus *Curcuma* adalah dari ukuran kromosomnya yang cenderung pendek dengan ukuran kromosom berkisar antara 0,99-0,24 μm .



Gambar 2. Kromosom Kunyit (*Curcuma longa*), $3n=63$ (Ravindran *et al.*, 2007)

Menurut pendapat Ravindran *et al.* (2007), tanaman triploid relatif steril karena meiosis pada tanaman triploid jarang terjadi dan disertai tingginya peluang munculnya trivalen dan univalent. Pendapat tersebut sejalan dengan pendapat Suryo (2007) dimana kekurangan dari tanaman dengan kromosom triploid adalah tanaman tersebut steril dikarenakan terjadi meiosis tidak teratur saat segregasi kromosom sehingga terbentuk bivalen dan univalen, atau trivalen, atau tiga buah univalen sehingga menghambat proses perpasangan kromosom. Didukung oleh pernyataan Raney (2006) bahwa tanaman triploid steril karena memiliki 3 set kromosom yang tidak dapat dibagi secara merata selama proses meiosis sehingga menghasilkan pemisahan yang tidak sama pada kromosom. Contoh kasus pada tanaman apel yang juga tergolong triploid dapat menghasilkan biji namun biji yang

dihasilkan mengalami abnormalitas (Suryo, 2007), sedangkan pada temulawak kromosom triploid menyebabkan bunga temulawak menjadi tidak sempurna dimana organ reproduksi dalam setiap kelopak bunga temulawak terjadi abnormalitas atau bahkan tidak terdapat organ reproduksi sama sekali (Gambar 3). Abnormalitas pada bunga temulawak tersebut yang menyebabkan temulawak tidak dapat memproduksi biji sehingga perkembangbiakan konvensional temulawak umumnya berlangsung secara vegetatif yaitu menggunakan rimpang.



Gambar 3. Bunga Temulawak (keterangan: a) Penampang melintang bunga temulawak; b) Mahkota bunga temulawak tanpa benang sari dan putik; c) Mahkota bunga temulawak dengan benang sari (Rulliyah, 2016)

Temulawak memiliki berbagai macam khasiat diantaranya yaitu sebagai hepatoprotektor (pelindung hati/pemulih hati dari kerusakan akibat racun), diuretik, anti inflamasi, dan peluruh kolesterol (Khareani, 2013). Khasiat obat temulawak tidak terlepas dari kandungan bahan aktif yang terdapat didalamnya. Bahan aktif utama yang terdapat di dalam rimpang temulawak adalah kurkumin dan xanthorrhizol (minyak atsiri). Menurut Said (2007), kurkumin temulawak memiliki khasiat yang lebih unggul dari kurkumin kunyit dalam hal memicu sekresi empedu sehingga memiliki potensi dalam pengobatan penyakit liver. Khasiat lain dari temulawak yaitu mengatasi gejala rematik, mencegah asam urat, dan menangkal radikal bebas sehingga dapat digunakan untuk menjaga kesehatan tubuh (Hermawati dan Dewi, 2014).

2.2. Roadmap Temulawak

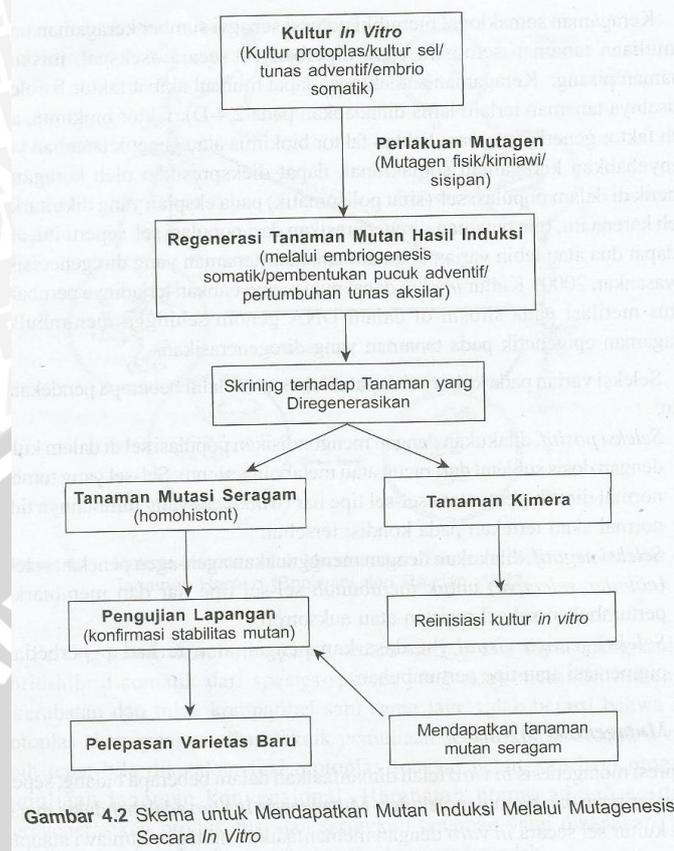
Berdasarkan hasil penelitian Wardiyati *et al.* (2010) yang dilakukan pada tahun 2008-2009 terhadap temulawak yang tersebar diberbagai titik di daerah Jawa dan Madura, didapatkan 20 klon temulawak dengan penamaan sesuai dengan lokasi asal klon tersebut. Pengujian terhadap 20 klon tersebut terkait dengan respon lingkungan terhadap kadar kurkumin dan hasil rimpang temulawak didapatkan bahwa temulawak klon Jember (UB₂) dan temulawak klon Pasuruan (UB₃) menunjukkan respon yang tinggi terhadap hasil rimpang (bobot rimpang). Temulawak UB₂ memiliki kadar kurkumin sebesar 0,59% dengan bobot rimpang per tanaman sebesar 1708 g, sedangkan temulawak UB₃ memiliki kadar kurkumin sebesar 0,58% dengan bobot rimpang per tanaman sebesar 1387,15 g. Berdasarkan hasil penelitian, kedua klon tersebut memiliki keunggulan yang sama yaitu dari segi bobot rimpang yang tergolong dalam grade A. Akan tetapi, menurut standar Anonymous^b (2008), kadar kurkumin temulawak yang baik yaitu tidak kurang dari 4%, sehingga diketahui bahwa kadar kurkumin temulawak UB₂ dan UB₃ belum memenuhi standar oleh karena itu dibutuhkan upaya lebih lanjut untuk meningkatkan kualitas terutama kadar kurkumin 2 klon temulawak tersebut.

Peningkatan kualitas tanaman dapat dilakukan dengan berbagai cara, salah satunya dengan poliploidisasi. Poliploidisasi adalah suatu usaha untuk mendapatkan organisme poliploid. Poliploid merupakan organisme yang memiliki jumlah set kromosom (genom) yang lebih dari sepasang (Suryo, 2007). Suryo (2007) menyatakan bahwa tanaman poliploid memiliki keunggulan dibandingkan dengan tanaman diploid dari segi morfologinya diantaranya seperti bagian tanaman (akar, daun, batang, bunga) yang terlihat lebih besar, buluh-buluh pengangkut dan stomata yang lebih besar, sel-sel pada epidermis tampak lebih jelas, dan inti sel yang juga lebih besar. Berdasarkan kandungannya tanaman poliploid memiliki kandungan protein dan vitamin yang lebih tinggi, serta kandungan senyawa aktif/metabolit sekunder yang lebih tinggi sehingga cocok untuk dikembangkan dengan tujuan untuk meningkatkan kualitas tanaman obat. Kandungan metabolit sekunder juga cenderung meningkat pada beberapa tanaman obat yang diinduksi poliploid sebagai contoh pada penelitian terhadap *Solanum khasianum* yang mengalami peningkatan kandungan solasodin sebesar 35-50% (Akerle, Heywood,

dan Sygne, 1991). Sedangkan kekurangan tanaman poliploid diantaranya yaitu seiring dengan bertambahnya jumlah kromosom terjadi berbagai hambatan diantaranya seperti tekanan osmotik sel yang berkurang, terhambatnya pembelahan sel, masa vegetatif lebih lama, tanaman rentan terhadap serangan hama dan/atau penyakit, dan berkurangnya fertilitas.

Poliploidi dapat terjadi dengan 2 cara yaitu secara alami dan secara buatan. Poliploidi secara alami merupakan hasil mutasi tanpa bantuan manusia yang berasal dari pembelahan sel tanaman diploid yang tidak teratur. Sedangkan poliploidi buatan dihasilkan dari metode induksi. Metode induksi poliploidi dapat menggunakan 2 cara yaitu metode fisika dan metode kimia. Kedua metode tersebut dibedakan berdasarkan bahan yang digunakan untuk memicu proses mutasi disebut dengan istilah mutagen. Mutagen fisika yang digunakan berasal dari radiasi ion seperti sinar-X, radiasi gamma, radiasi beta, neutrons, dan partikel dari aselerators (Soeranto, 2003). Sedangkan mutagen kimia yang biasa digunakan merupakan larutan kimia yang berasal dari senyawa alkyl seperti Ethyl Methane Sulphonate (EMS), Diethyl Sulphate (DES), Methyl Methane Sulphonate (MMS), kolkisin (Soeranto, 2003), dan Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) (Sulistyaningsih *et al.*, 2005; Herawati *et al.*, 2015).

Temulawak memiliki kromosom triploid ($3n$) sehingga perbanyakannya hanya dapat dilakukan dengan perkembangbiakan vegetatif. Secara alami perkembangbiakan temulawak menggunakan tunas, namun perkembangbiakan temulawak juga dapat dilakukan secara buatan melalui vegetatif buatan dengan metode perbanyakan *in vitro* atau kultur jaringan (Syahid, 2007; Seswita, 2010; Kristina dan Syahid, 2012). Metode kultur jaringan temulawak memiliki keunggulan yaitu terdapat lebih banyak pilihan bagian tanaman yang digunakan untuk perbanyakan, berbeda dari perbanyakan vegetatif alami yang hanya dapat menggunakan rimpang. Bagian tanaman yang dapat digunakan sebagai eksplan untuk perbanyakan tanaman yang tergolong dalam famili zingiberaceae diantaranya yaitu bagian daun (Saensouk, 2011) dan tunas (Parthasarathy dan Sasikumar, 2006; Syahid, 2007; El-Nabarawy, El-Kafafi, Hamza, dan Omar, 2015; Sarma, Deka, Sarma, dan Sarma, 2011).



Gambar 4. Alur untuk Mendapatkan Tanaman Mutan Melalui Mutagenesis *In Vitro* (Zulkarnain, 2011)

Menurut Minelo (1990), kultur jaringan tanaman umumnya digunakan untuk penelitian yang bersifat akademis terutama yang berhubungan dengan ilmu tanaman, namun dewasa ini kultur jaringan tanaman juga digunakan untuk membantu dalam modifikasi genetik tanaman. Salah satu teknik dalam pemuliaan *in vitro* adalah teknik mutagenesis *in vitro* (Gambar 4) yang memanfaatkan mutagen fisika ataupun kimia untuk menginduksi mutagenesis pada eksplan yang dikulturkan sehingga diperoleh tanaman mutan yang diinginkan. Tujuan dilakukannya induksi mutagenesis salah satunya adalah untuk menciptakan varietas tanaman baru yang lebih unggul daripada varietas tanaman sebelumnya, contohnya tanaman poliploid. Teknik mutagenesis *in vitro* kemudian akan menghasilkan keragaman somaklonal. Keragaman somaklonal adalah keragaman fenotip yang muncul akibat dari proses mikropropagasi. Keragaman somaklonal yang muncul dapat dimanfaatkan sebagai sumber keragaman genetik terutama pada tanaman yang diperbanyak secara aseksual seperti temulawak.

2.3. Asam 2,4-Diklorofenoksiasetat (2,4-D) dan Benzil Adenin (BA) dan Fungsinya untuk Induksi Poliploidi secara *In Vitro*

Pertumbuhan tanaman dapat dipengaruhi oleh 2 faktor yaitu faktor internal dan faktor eksternal. Faktor internal berasal dari genotip tanaman, sedangkan faktor eksternal berasal dari lingkungan tumbuh tanaman. Menurut Gardner, Pearce, dan Mitchel (2008), pertumbuhan merupakan akibat dari interaksi antara genotip dengan lingkungan. Pada teknik kultur jaringan respon pertumbuhan eksplan yang dikulturkan juga dipengaruhi oleh kedua faktor tersebut. Masing-masing genotip memiliki kemampuan regenerasi yang berbeda-beda yang dapat dilihat dari kapasitas regeneratifnya (Zulkarnain, 2011). Faktor lingkungan yang menjadi penentu dalam kultur jaringan adalah ZPT yang digunakan. ZPT yang diberikan perlu diperhatikan konsentrasinya karena konsentrasi ZPT yang berbeda dapat memberikan pengaruh yang berbeda pada pertumbuhan tanaman. Berdasarkan beberapa hasil penelitian yang mempelajari mengenai respon tanaman terhadap kombinasi antara varietas (genotip) dengan konsentrasi ZPT yang digunakan dalam teknik kultur jaringan menunjukkan bahwa genotip yang berbeda memberikan respon yang berbeda terhadap konsentrasi ZPT yang diberikan (Muda, Khalid, dan Ibrahim, 2004; Purnamaningsih, 2006; Basri, 2008).

Keberhasilan kultur jaringan ditentukan oleh beberapa faktor, salah satunya Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) yang digunakan. Penggunaan ZPT dapat berupa ZPT tunggal ataupun kombinasi dengan berbagai konsentrasi. Pemilihan jenis ZPT yang digunakan dapat didasari oleh berbagai tujuan seperti hasil akhir yang diinginkan, eksplan yang diperbanyak untuk memperoleh kalus dapat berbeda pemilihan jenis hormon dan konsentrasinya dengan eksplan untuk memperoleh tunas dan/atau akar. Konsentrasi 2,4-D yang tepat untuk menumbuhkan kalus contohnya pada penelitian El-Nabarawy *et al.* (2015) yang menggunakan eksplan tunas jahe diberikan perlakuan kombinasi hormon BA dan 2,4-D dengan konsentrasi terbaik pada kombinasi 0,5 mg L⁻¹ BA dan 1 mg L⁻¹ 2,4-D, sedangkan untuk membentuk tunas pada penelitian Saensouk (2011) yang menggunakan eksplan daun tanaman *Cornukaempferia aurantiflora* (famili Zingiberaceae) diperoleh hasil kombinasi hormon BA dan 2,4-D yang terbaik untuk pertumbuhan tunas pada konsentrasi 0,1 mg L⁻¹ 2,4-D dan 5 mg L⁻¹ BA. Berdasar hasil penelitian Sarma *et al.* (2011),

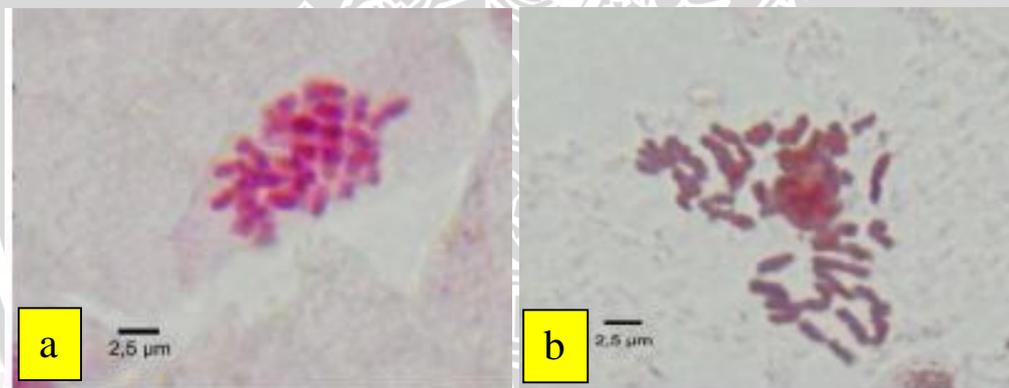
kombinasi hormon 2,4-D dan BA terhadap eksplan tunas kunyit dengan tujuan untuk penggandaan tunas didapatkan pada kombinasi 1 mg L⁻¹ BAP dan 4 mg L⁻¹ 2,4-D. Berbeda dengan hasil penelitian Zuraida *et al.* (2014) yang memperoleh kombinasi hormon 2,4-D BAP terbaik pada kombinasi 0,2 mg L⁻¹ 2,4-D 5 mg L⁻¹ BAP untuk pembentukan eksplan tunas *Curcuma caesia*.

Asam 2,4-Diklorofenoksiasetat (2,4-D) merupakan senyawa kimia yang termasuk dalam kelompok ZPT golongan auksin sintetis. Auksin berfungsi dalam memacu pembelahan sel tanaman sehingga mempengaruhi proses morfogenesis tanaman diantaranya penentuan pola embrio, diferensiasi jaringan pengangkut, penentuan pola tunas dan akar, tropisme dan percabangan (Alabadi, Blazquez, Carbonell, Ferrandiz, dan Perez-Amador, 2008). 2,4-D umumnya digunakan sebagai pembasmi gulma (herbisida) namun seiring dengan berkembangnya berbagai penelitian diketahui bahwa 2,4-D juga berguna sebagai mutagen yang dapat memicu peningkatan jumlah kromosom (Anonymous^a, 2004). Konsentrasi 2,4-D yang digunakan untuk tanaman monokotil biasanya berkisar antara 2–10 mg L⁻¹ sedangkan pada tanaman dikotil berkisar antara 0,001–2 mg L⁻¹ (Lidya, 2013). Sejalan dengan pendapat Trigiano dan Gray (2011) bahwa 2,4-D yang dibutuhkan untuk membentuk kalus pada tumbuhan monokotil berkisar antara 10-50 µM atau setara dengan 2-11 ppm.

Benzil Adenin (BA) merupakan ZPT yang tergolong dalam kelompok sitokinin sintetis karena tidak lazim ditemukan di dalam tanaman (Salisbury dan Ross, 1995) yang memiliki fungsi utama dalam memacu pembelahan sel. BA merupakan salah satu sitokinin yang sering digunakan untuk menstimulasi perkembangbiakan tunas dan pembentukan kalus pada tanaman berkayu dan tumbuhan berbatang lunak (*herbaceous*) (Trigiano dan Gray, 2011). Berdasarkan penelitian Singh, Singh, Devi, Singh, Singh, dan Devi (2015) pada tunas temu ireng pemberian ZPT BAP 3 ppm yang dikombinasikan dengan NAA 0,5 ppm dapat memicu multiplikasi tunas, sejalan dengan penelitian Jala (2012) yang memperoleh hasil multiplikasi tunas dan jumlah daun eksplan terbaik pada perlakuan 2 atau 3 mg L⁻¹ BA + 1 mg L⁻¹ NAA untuk eksplan tunas kunyit.

Kombinasi antara sitokinin dan auksin telah banyak digunakan dalam teknik kultur jaringan dimana konsentrasi keduanya diberikan tergantung pada tujuan

akhir yang ingin dicapai. Menurut George (1993) kombinasi level auksin yang lebih tinggi daripada sitokinin dapat memicu pembentukan kalus pada tanaman monokotil, sebaliknya sitokinin dalam level yang lebih tinggi dari auksin dapat memicu terbentuknya tunas adventif. Kombinasi BA dan 2,4-D biasa digunakan untuk memperoleh kalus namun kombinasi keduanya juga dapat digunakan untuk menginduksi poliploid tanaman seperti pada penelitian Herawati *et al.* (2015) terhadap eksplan daun *Artemisia cina*. Berdasarkan hasil penelitian tersebut diperoleh 4 level poliploid dimana persentase ploidi terbesar diperoleh pada level ploidi $2n=4x=36$ yaitu 28,57% dan kombinasi terbaik pada kombinasi hormon 2,4-D 2 mg L^{-1} dengan BA 1 mg L^{-1} dengan persentase tanaman poliploid 23% (gambar 5b). Sejalan dengan penelitian Sulistyaningsih *et al.* (2005) terhadap eksplan bunga bawang merah yang juga diinduksi poliploid dengan BA dan 2,4-D diperoleh hasil eksplan bawang merah tetraploid ($2x=32$). Kedua penelitian tersebut menguatkan hipotesis bahwa BA dan 2,4-D dapat digunakan untuk menginduksi poliploid tanaman.



Gambar 5. Kromosom *Artemisia cina* (keterangan: a) Kromosom diploid *Artemisia cina*, $2n=2x=18$; b) Kromosom tetraploid *Artemisia cina*, $2n=4x=36$) (Herawati *et al.*, 2015)