

# KANDUNGAN FENOL DAN LIGNIN TANAMAN NILAM HIBRIDA (*Pogostemon* sp.) HASIL FUSI PROTOPLAS

YANG NURYANI, IKA MUSTIKA, dan CHEPPY SYUKUR

Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat, Bogor

## RINGKASAN

Salah satu masalah yang dihadapi dalam budidaya nilam adalah serangan nematoda (*Pratylenchus brachyurus*). Usaha peningkatan ketahanan terhadap penyakit tersebut melalui metode konvensional sulit dilakukan, karena tanaman nilam tidak berbunga. Salah satu usaha yang dapat ditempuh dalam meningkatkan ketahanan nilam terhadap nematoda adalah melalui fusi protoplas. Sampai saat ini telah diperoleh 30 klon hasil fusi (hibrida somatik) antara nilam Aceh (Sidikalang dan Tapak Tuan, *Pogostemon cablin*) dengan nilam Jawa (Girilaya, *P. heyneanus* Benth.). Telah diketahui bahwa ketahanan terhadap nematoda antara lain ditentukan kadar fenol dan lignin pada akar. Oleh karena itu, untuk mengetahui tingkat ketahanan terhadap nematoda dari berbagai klon hasil fusi protoplas pada tahap awal didekati melalui evaluasi kadar fenol dan lignin pada akar tanaman. Penelitian dilakukan di laboratorium Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan, Bogor pada bulan Nopember 2000. Kadar fenol ditentukan dengan *high performance liquid chromatography* (HPLC), sedang kadar lignin ditentukan dengan metode pengabuan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa nilam Jawa (klon Girilaya) mengandung kadar fenol dan lignin yang lebih tinggi (76.53 dan 21 900 ppm) dan nilam Aceh (klon Sidikalang dan Tapak Tuan) 38.30-81.45 dan 8 000-7 200 ppm). Kadar fenol dan lignin pada hasil fusi polanya berbeda pada tiap pasangan. Pada hasil fusi Girilaya dengan Sidikalang, semua klon hasil fusi kadar fenolnya lebih rendah dari kedua induknya dan kadar ligninnya sebagian (29%) memiliki kadar lignin antara kedua induknya dan sisanya (71%) lebih rendah dari kedua induknya. Sementara itu, dari fusi Girilaya x Tapak Tuan 1 klon (4%) memiliki kedua induknya (38.75-60.12 ppm). Selanjutnya untuk kadar lignin 78% berada antara kedua induknya (8 090-2 140 ppm), sisanya lebih rendah dari kedua induknya (5 350-7 090). Berdasarkan kandungan fenol dan lignin pada 30 genotipa hasil fusi protoplas dibagi dalam 3 kelompok yaitu : kelompok I terdiri dari 5 genotipa dengan kandungan fenol tinggi, kelompok II terdiri dari 9 genotipa dengan kandungan lignin tinggi dan kelompok III terdiri dari 1 genotipa dengan kandungan fenol dan lignin tinggi.

Kata kunci : *Pogostemon* sp, genotipa hasil fusi protoplas, kandungan fenol dan lignin, ketahanan tanaman, nematoda

## ABSTRACT

### *Evaluation of phenols and lignin in the root of hybrid patchouli (Pogostemon cablin Benth.) from protoplast fusion*

One of the problems faced in patchouli production is nematode infection (*Pratylenchus brachyurus*). Improvement of the plant resistance to nematode in patchouli is difficult to be conducted through conventional method as the plant never flowers. One of the methods of improving the plant resistance is by using protoplast fusion of Aceh patchouli (*Pogostemon cablin*, cv Sidikalang) and Java patchouli (*P. heyneanus*, cv Girilaya). It has been found that the plant resistance to nematode is closely related to phenols and lignin content of the root. Therefore, the level of resistance of different clones of somatic hybrids to nematode was approached by evaluating the content of phenols and lignin of the roots. The study was conducted at the laboratory of the Research Institute for Food Crop Biotechnology, Bogor in November 2000. Phenol content was determined with high performance liquid

chromatography (HPLC), while lignin content was determined with Klason method. Result showed that Java patchouli (Girilaya) contained phenols and lignin respectively 76.53 and 21 900 pp, higher than those of Aceh patchouli (Sidikalang and Tapak Tuan) respectively 38.2-81.45 and 8 000-7 200 ppm. Phenol and lignin content in the somatic hybrids were different in the respective pairs. In the fusion of Girilaya x Sidikalang, all clones contained phenol lower than those of their parents, some clones (29%) contained lignin higher than Sidikalang but lower than Girilaya, and the rest (71%) contained lignin lower than the two parents. Meanwhile, from the fusion of Girilaya, Tapak Tuan, 1 clone (4%) contained phenols higher than those of the two parents (97 ppm), 39% contained phenols higher than Tapak Tuan but lower than Girilaya (38.75-60.12 ppm) and the rests (60%) contained phenol lower than the two parents. Furthermore, the lignin content, of 78% somatic hybrids was lower than Girilaya but higher than Tapak Tuan, but the rest (22%) was lower than the two parents. Based on the distribution of phenols and lignin content, the somatic hybrids can be categorized in three group. The first groups (5 clones) contained high phenols (higher than the average), the second group (9 clones) contained high lignin, and the third (1 clone) contained high phenol and lignin.

Key words : *Pogostemon* sp., genotype, protoplast fusion, phenol, lignin, plant resistance, nematode

## PENDAHULUAN

Nilam (*Pogostemon cablin* Benth.) merupakan tanaman penghasil minyak atsiri yang penting sebagai pengasil devisa. Indonesia merupakan pemasok minyak nilam terbesar di pasaran dunia dengan kontribusi sekitar 80%. Pada tahun 1999 ekspor minyak nilam sejumlah 1356 ton dengan nilai US \$ 53 juta (ANON., 1998). Kegunaan minyak nilam adalah untuk bahan-bahan kosmetik, parfum, antiseptik dan insektisida.

Kendala-kendala dalam usaha pengembangan tanaman nilam antara lain serangan nematoda (MUSTIKA dan ROSTIANA, 1992). Nilam yang umum dibudidayakan di Indonesia adalah nilam Aceh yang berkadar minyak tinggi (NURYANI dan HADIPOENTYANTI, 1994) namun peka terhadap nematoda (NURYANI *et al.*, 1999). Untuk mendapatkan nilam yang toleran terhadap nematoda dan berkadar minyak tinggi telah dilakukan fusi protoplas antara nilam Jawa (yang toleran terhadap nematoda) dan nilam Aceh. Hasil fusi protoplas diperoleh genotipa-genotipa baru dengan keragaman tinggi (NURYANI *et al.*, 2001).

Ketahanan tanaman terhadap nematoda dapat terjadi secara fisik maupun kimiawi (DROPKIN, 1989). Hasil penelitian terdahulu menunjukkan bahwa ketahanan berbagai jenis tanaman terhadap nematoda disebabkan karena adanya kandungan fenol dan lignin pada akar tanaman tersebut (GIEBEL, 1982 ; FOGAIN & GOWEN, 1996 ; VOLETTE *et al.*, 1998).

Untuk mengetahui kandungan fenol dan lignin pada genotipa baru hasil fusi protoplas antara nilam Jawa dan nilam Aceh, dilakukan analisis fenol dan lignin. Nomor-nomor dengan kandungan fenol dan lignin tinggi merupakan nomor-nomor harapan yang diharapkan mempunyai sifat toleransi terhadap nematoda. Tujuan dari penelitian ini adalah mendapatkan nomor-nomor yang mempunyai klon dengan fenol dan atau lignin tinggi, dihubungkan dengan ketahanannya terhadap nematoda.

## BAHAN DAN METODE

Bahan yang dipergunakan dalam penelitian ini adalah akar planlet tanaman nilam yang berumur  $\pm$  4 bulan di dalam botol kultur. Jumlah nomor-nomor yang diuji adalah 33 nomor terdiri dari 3 tetua yaitu : Girilaya (nilam Jawa), Sidikalang dan Tapak Tuan 75. Tapak Tuan 75 adalah salah satu nomor hasil somaklonal dari Tapak Tuan 75 (MARISKA *et al.*, 1997) (nilam Aceh) dan 30 genotipa nilam hasil fusi protoplas antara nilam Jawa dan nilam Aceh, yaitu 2 IV 1, 2 IV 2, 2 IV 3, 2 IV 4, 2 IV 5, 2 IV 6, 2 IV 8, 9 II 2, 9 II 3, 9 II 4, 9 II 7, 9 II 8, 9 II 10.01, 9 II 10.02, 9 II 16, 9 II 20, 9 II 21, 9 II 33, 9 II 34, 9 IV 1, 9 IV 2, 9 IV 3, 9 IV 4, 9 IV 5, 9 IV 6, 9 IV 9, 9 IV 13, 9 IV 14, 9 IV 16, 9 IV 19. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi Tanaman Pangan pada bulan Nopember 2000.

### Penentuan Kadar Fenol

Sebanyak 1 g akar dari setiap nomor diekstraksi dengan larutan asetat 1% dalam metanol 70% sebanyak 10 ml. Larutan tersebut dihomogenizer sampai benar-benar hancur, kemudian disaring dengan kertas saring Whatman 40 mm. Setelah disaring, diinjeksikan pada chromatograf (HPLC) untuk mengetahui kadar fenolnya.

### Penentuan Kadar Lignin

Analisis kandungan lignin total dilakukan dengan metoda Klason (AMPRIYANTONO *et al.*, 1989). Sebanyak 1 g akar dari setiap nomor dimasukkan ke dalam erlenmeyer, di tambahkan 20 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat, didiamkan selama 2 jam, kemudian dikocok perlahan-lahan. Akar tersebut kemudian dipindahkan ke dalam erlenmeyer 500 ml, ditambahkan 50 ml air bebas ion, dan dipanaskan di atas water bath selama 3 jam. Setelah 3 jam, larutan disaring di "vacum pump" dengan menggunakan kertas saring yang telah diketahui bobotnya (A). Erlenmeyer dan corong dibilas dengan air sebanyak 3 kali. Kertas saring dan residu ditempatkan dalam oven dengan suhu 105°C selama 1-2 jam. Kertas saring dan residu didinginkan kemudian ditimbang (B). Bahan diabukan dalam "muffle furnance" pada suhu 600°C selama 3-4 jam, didinginkan dan ditimbang (C).

$$\text{Kadar lignin (\%)} = \frac{B-A-C}{1 \text{ g}} \times 100\%$$

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kandungan fenol pada akar Girilaya (nilam Jawa) dan Sidikalang (nilam Aceh) (76.53 ppm dan 81.45 ppm) lebih tinggi dibanding dengan Tapak Tuan 75 (nilam Aceh) (38.20 ppm). Sedangkan kandungan lignin pada akar Girilaya (20.190 ppm) lebih tinggi dibandingkan dengan Sidikalang dan Tapak Tuan 75 (8 000 ppm dan 7 200 ppm).

Dari penelitian terdahulu menunjukkan bahwa Girilaya lebih toleran terhadap nematoda, Sidikalang agak rentan sedangkan Tapak Tuan 75 termasuk rentan. Persentase kerusakan akar akibat serangan nematoda pada Girilaya, Sidikalang dan Tapak Tuan 75 berturut-turut sebesar 6.47%, 11.11% dan 28.29% (NURYANI *et al.*, 1999).

Berdasarkan analisa fenol dan lignin dihubungkan dengan ketahanan terhadap nematoda, diduga bahwa yang berperan dalam mekanisme ketahanan Girilaya terhadap nematoda adalah tingginya kandungan fenol dan lignin di dalam akar. Sedangkan pada Sidikalang kemungkinan yang berperan dalam mekanisme ketahanannya terhadap nematoda adalah kandungan fenol yang tinggi (MUSTIKA *et al.*, 2001).

Hasil penelitian tersebut di atas, sejalan dengan hasil penelitian pada tanaman pisang, dimana kandungan senyawa fenolik pada tanaman pisang kultivar toleran dan agak toleran terhadap nematoda (*Radopholus similis*), lebih tinggi dibandingkan dengan kultivar rentan. Ditemukan adanya 2 kemungkinan terjadinya mekanisme ketahanan terhadap nematoda *R. similis* yaitu karena kandungan senyawa fenol dan lignin yang tinggi (FOGAIN dan GOWEN, 1996; VOLETTE *et al.*, 1998). Senyawa fenol dan lignin hubungannya sangat erat karena senyawa fenol selanjutnya dapat membentuk lignin yang merupakan proteksi alami dari tanaman terhadap serangan faktor biotik (NELSON, 1981).

Ketahanan suatu tanaman terhadap nematoda terjadi melalui beberapa mekanisme antara lain melalui pra-pembentukan molekul beracun, adanya penghalang fisik, reaksi hipersensitif dan terbentuknya senyawa anti mikroba (fitoaleksin) (GIEBEL, 1982; DROPKIN, 1989).

Dalam sepuluh tahun terakhir, beberapa penelitian menunjukkan bahwa ketahanan tanaman terhadap serangan nematoda terjadi secara fisik dan biokimia (DALMASO *et al.*, 1992). Beberapa penelitian menunjukkan bahwa tanaman yang tahan terhadap serangan nematoda mengandung sejumlah senyawa fenolik yang lebih tinggi dibanding dengan tanaman rentan. Senyawa fenolik diketahui disamping dapat membentuk lignin juga dapat meningkatkan kandungan auksin alami yang selanjutnya dapat membentuk tyloses sebagai penghalang fisik dalam menghadapi serangan faktor biotik (NELSON, 1981).

Keturunan dari fusi protoplas (hibrida somatik) berbeda polanya, bila yang difusikan berbeda genotipanya. Hasil fusi (hibrida somatik) antara Girilaya (G) dengan Sidikalang (S) kadar fenolnya lebih rendah dari kedua induknya, sedangkan pada hibrida somatik antara Girilaya

dengan Tapak Tuan (T) terdapat satu klon (4%) yang kadar fenolnya lebih tinggi dari kedua induknya dan 9 klon (39%) berada di antara kedua induknya ( $\leq$  dari Girilaya dan  $\geq$  dari Tapak Tuan) dan sisanya (57%) lebih rendah dari kedua induknya. Sementara itu penurunan sifat kadar lignin berbeda pula dengan pola penurunan kadar fenol. Hasil fusi antara Girilaya dengan Sidikalang (G x S) dari 7 klon yang diperoleh, 2 klon (29%) memiliki kadar lignin antara kedua induknya. Sebaliknya pada hasil fusi antara Girilaya dengan Tapak Tuan (G x T) dari 23 klon yang diperoleh, 18 klon (78%) di antaranya memiliki kadar lignin antara kedua induknya ( $\geq 8 \leq 21.9$ ).

Pada 30 genotipa baru hasil fusi protoplas, kandungan fenol berkisar antara 11.60 ppm-60.12 ppm., sedangkan kandungan lignin antara 4 026 ppm-24 140 ppm. Berdasarkan kandungan fenol dan lignin tersebut terdapat 3 kelompok nomor nilam yang akan membedakan mekanisme ketahanannya terhadap nematoda yaitu: Kelompok I terdiri atas nomor-nomor nilam dengan kandungan fenol tinggi yaitu 2 IV 8, 9 II 7, 9 II 10, 9 II 21, 9 II 33 dan 9 IV 14, kelompok II terdiri atas nomor-nomor dengan kandungan lignin tinggi yaitu 2 IV 1 (G x S), 9 II 3, 9 II 8, 9 II 16, 9 II 20, 9 II 34, 9 IV 2, 9 IV/6 dan 9 IV 13 dan kelompok III terdiri atas satu nomor dengan kandungan fenol dan lignin tinggi yaitu nomor 9 IV 14 (Tabel 1).

Pada kelompok I (kandungan fenol tinggi: 5075 ppm-97.40 ppm), nomor 9 II 33 yang merupakan hasil fusi protoplas antara Girilaya x Tapak Tuan 75 mempunyai kandungan fenol 97.40 ppm lebih tinggi dari tetua Girilaya (76.53 ppm).

Pada kelompok II (kandungan lignin tinggi 20 340 ppm-28 090 ppm) terdapat 2 nomor yaitu nomor 9 II 34 (28 040 ppm) dan nomor 9 IV 13 (24 140 ppm), hasil fusi protoplas antara Girilaya x Tapak Tuan 75 yang kandungan ligninnya lebih tinggi dari tetua Girilaya (21 900 ppm).

Sedangkan pada kelompok III hanya ada satu nomor yaitu nomor 9 IV 14 dengan kandungan fenol (60.42 ppm) dan lignin (24 140 ppm) tinggi. Nampaknya kandungan fenol atau lignin tinggi lebih banyak terdapat pada genotipa-genotipa 9 II hasil fusi protoplas antara Girilaya dan Tapak Tuan 75. Dilihat dari kandungan fenol maupun lignin Tapak Tuan 75 yang sangat rendah, besar kemungkinan sifat-sifat tersebut (fenol atau lignin tinggi) diperoleh dari tetua Girilaya yang baik kandungan fenol maupun ligninnya tinggi. Nomor baru tersebut sangat menarik untuk diteliti lebih lanjut ketahanannya terhadap nematoda serta kadar minyaknya diharapkan sama bahkan lebih tinggi dari Tapak Tuan 75.

Adanya fenol pada akar pada beberapa nomor hasil fusi merupakan mekanisme ketahanan secara biokimia. Pada evaluasi ini hanya dianalisis kandungan fenol total. Untuk mengetahui karakteristik dan spesifikasi dari fenol perlu dilakukan penelitian lebih lanjut. Menurut FOGAIN dan GOWEN (1996) akar yang lebih berkayu (lignin tinggi) merupakan indikasi tanaman lebih toleran. Sedangkan menurut DROPKIN (1989), dinding sel tanaman terhindar

Tabel 1. Kandungan fenol dan lignin di dalam akar 3 tetua dan 30 genotipa hasil fusi protoplas

Table 1. Phenol and lignin contents of 3 parents and 30 genotypes derived from protoplast fusion

Nomor urut Number	Tetua dan genotipa hasil fusi Name of parents and genotypes	Fenol Phenol (ppm.)	Lignin Lignin (ppm.)
1	Girilaya (Jawa)	76.53	21 900
2	Sidikalang (Aceh)	81.45	8 000
3	Tapak Tuan 75 (Aceh)	38.20	7 200
	<b>G X S</b>		
4	2 IV 1-0.6	15.33	20 410
5	2 IV 2-0.1	37.68	4 026
6	2 IV 3-0.7	11.76	6 350
7	2 IV 4-0.1	26.56	10 420
8	2 IV 5-0.1	30.73	6 320
9	2 IV 6-0.8	29.13	4 213
10	2 IV 8-0.2	54.01	7 090
	<b>G X TT 75</b>		
11	9 II 2-0.7	11.60	11 125
12	9 II 3-0.1	34.64	20 460
13	9 II 4-0.1	39.25	10 730
14	9 II 7-0.2	51.39	8 090
15	9 II 8-1.2	24.25	20 340
16	9 II 10-0.1	31.36	10 450
17	9 II 10-0.2	50.75	9 060
18	9 II 16-0.1	37.50	21 080
19	9 II 20-0.4	12.24	21 140
20	9 II 21-0.2	57.21	11 125
21	9 II 33	97.40	5 350
22	9 II 34-0.1	38.75	28 090
	<b>G X 77 75</b>		
23	9 IV 1-0.8	24.55	6 040
24	9 IV 2-0.2	41.80	21 160
25	9 IV 3-0.1	44.06	8 230
26	9 IV 4-0.5	10.70	6 290
27	9 IV 5-0.4	42.80	16 040
28	9 IV 6-0.1	35.09	21 060
29	9 IV 9-0.1	20.62	4 090
30	9 IV 13-0.1	24.80	20 460
31	9 IV 14-0.1	60.12	24 140
32	9 IV 16-0.9	18.55	16 230
33	9 IV 19-0.1	21.99	5 460

dari serangan patogen dengan cara menimbun lignin atau suberin di dalam dinding sel. Adanya lignin pada atau melapisi dinding sel merupakan mekanisme ketahanan secara fisik.

## KESIMPULAN

Dari hasil analisis fenol dan lignin pada akar tetua dapat disimpulkan bahwa ketahanan tetua Girilaya terhadap nematoda kemungkinan disebabkan oleh kandungan fenol dan lignin yang tinggi. Sedangkan pada tetua Sidikalang yang agak toleran terhadap nematoda kemungkinan disebabkan oleh kandungan fenolnya yang tinggi.

Dari 30 genotipa hasil fusi protoplas, hanya pada satu nomor yaitu 9 IV 14 yang mengandung fenol dan lignin tinggi.

Genotipa baru hasil fusi protoplas dengan kandungan fenol maupun lignin tinggi merupakan nomor-nomor harapan yang kemungkinan toleran terhadap nematoda.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Ir. Lalu Sukarno yang telah membantu menganalisa fenol dan lignin dan Dr. Ika Mariska yang telah memberikan masukan dalam melengkapi makalah ini.

#### DAFTAR PUSTAKA

- ANONYMOUS, 1998, Statistik Perdagangan Luar Negeri. Indonesia Jilid II. BPS . Jakarta-Indonesia. p.978.
- APRIYANTONO, A., D. FARDIAZ, N. PUSPITASARI, SEDARWATI dan S. BUDIYANTO, 1989. Analisis Pangan. Petunjuk Laboratorium IPB. 53p.
- DALMOSO, A., P. CASTAGNON-SERENO and P. ABAD, 1992. Tolerance and resistance of plants to nematodes-knowledge needs and prospects. *Nematological* 38 : 466-472.
- DROPKIN, V. H., 1989. Introduction to Plant Nematology Second Edition. John Wiley & Sons, Inc.
- FOGAIN, R., and S.R. GOWEN, 1996. Investigations on possible mechanisms of resistance to nematodes in *Musa Euphytica* 92 : 375-381. Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.
- GIEBEL, J., 1982. Mechanism of resistance to plant nematodes *Ann. Rev. Phytopathol.* 20 : 257-279.
- MARISKA, I., E. GATI, HOBIR, E. SYAMSUDIN dan D. SESWITA, 1997. Peningkatan keragaman genetik nilam melalui variasi somaklonal. Laporan RUT II.
- MUSTIKA, I. and O. ROSTIANA, 1992. The growth of four patchouli cultivars infected with *Pratylenchus brachyurus*. *Journal of Spice and Medicinal Crops* 1 (2) 11-18.
- MUSTIKA, I., Y. NURYANI dan R. HARNI, 2001. Kajian mekanisme ketahanan nilam (*Pogostemon* spp.) terhadap *Pratylenchus brachyurus* secara *in vitro*. Tidak dipublikasikan. 11p.
- NELSON, P.E., 1981. Life cycle and epidemiology of *Fusarium oxysporum* In M.E. Mael, A.A. Ball and C.H. Beckman. *Fungol with disease of plants*. Academic Press. New York. 640p.
- NURYANI, Y. dan HADIPOENTYANTI, 1994. Koleksi, konservasi dan evaluasi plasma nutfah tanaman atsiri. Review hasil dan program penelitian plasma nutfah pertanian. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Deptan. p.209-219.
- NURYANI, Y., CHEPPY SYUKUR, RITA HARNI, YELNITITIS, REPIANYO dan IKA MUSTIKA, 1999. Tanggapan beberapa klon nilam (*Pogostemon cablin* Benth.) terhadap nematoda pelubang akar (*Radopholus similis* Cobb.) *Jurnal LITTRI* 5 (3) : 103-109.
- NURYANI, Y., IKA MARISKA, CHEPPY SYUKUR, ALI HUSNI dan SRI UTAMI, 2001. Peningkatan keragaman genetik nilam (*Pogostemon* sp.) melalui fusi protoplas. Makalah Disampaikan pada Seminar Nasional XV dan Kongres IX Perhimpunan Biokimia dan Biologi Molekuler Indonesia Tanggal 4-5 Juli 2001. Di Hotel Safari Garden, Cisarua, Bogor 15p. (belum diterbitkan).
- VOLLETTE, C., C. ANDARY ; J.P. GEIGER ; J.L. SARAH, and M. NICOLE. 1998. Histochemical and Cytochemical Investigations of Phenols in Roots of Banana Infected by the Burrowing Nematode *Radopholus similis*. The American Phytopathological Society.