

BAB II

KAJIAN PUSTAKA

2.1 Purwoceng (*Pimpinella alpina* Molk.)

Purwoceng (*Pimpinella alpina* Molk.) adalah tanaman obat langka asli Indonesia yang memiliki berbagai manfaat sebagai obat dan dikategorikan hampir punah. Habitat asli tanaman purwoceng sudah punah dengan rusaknya hutan konservasi akibat kegiatan eksploitasi yang berlebihan sehingga konservasi *in situ* (pada habitatnya) tidak dapat diandalkan. Konservasi *ex situ* (di luar habitatnya) akan lebih sesuai untuk diterapkan. Tanaman purwoceng sulit dibudidayakan di luar habitatnya dan memerlukan persyaratan agronomis yang spesifik sehingga konservasi *ex situ* di lapang juga menghadapi permasalahan. Pemeliharaan tanaman di lapang juga akan membutuhkan area, tenaga, waktu, dan biaya yang besar. Dengan demikian, konservasi *in vitro* merupakan alternatif yang dapat diterapkan untuk menghindari kepunahan tanaman purwoceng (Darwati, 2006).

Purwoceng merupakan tanaman herba komersial yang akarnya dilaporkan berkhasiat obat sebagai afrodisiak (meningkatkan gairah seksual dan menimbulkan ereksi), diuretik (melancarkan saluran air seni), dan tonik (mampu meningkatkan stamina tubuh). Tanaman tersebut merupakan tanaman asli Indonesia yang hidup secara endemik di daerah pegunungan seperti dataran tinggi Dieng di Jawa Tengah, Gunung Pangrango di Jawa Barat, dan area pegunungan di Jawa Timur. Dewasa ini populasi purwoceng telah langka

karena mengalami erosi genetik secara besar-besaran, bahkan populasinya di Gunung Pangrango Jawa Barat dan area pegunungan di Jawa Timur dilaporkan telah musnah. Rahardjo (2003) dan Syahid *et al.* (2004) melaporkan bahwa saat ini tanaman tersebut hanya terdapat di dataran tinggi Dieng, bukan di habitat aslinya melainkan di areal budi daya yang sangat sempit di Desa Sekunang (Hernani, 1991).

Purwoceng banyak tumbuh secara liar di kawasan Dieng pada ketinggian 2.000-3.000 m dpl. Menurut Badan Penelitian dan Pengembangan Kehutanan (1987), sebaran tanaman purwoceng di Indonesia meliputi Jawa Tengah, Jawa Timur, dan Jawa Barat. Purwoceng dapat tumbuh di luar habitatnya seperti di Gunung Putri Jawa Barat dan mampu menghasilkan benih untuk bahan konservasi. Potensi tanaman purwoceng cukup besar, tetapi masih terkendala oleh langkanya penyediaan benih dan keterbatasan lahan yang sesuai untuk tanaman tersebut (Yuhono 2004).

Klasifikasi:

Divisi Spermatophyta

Sub divisi Angiospermae

Kelas Dicotyledone

Famili Apiaceae

Genus *Pimpinella*

Spesies *Pimpinella alpina* Molk (Lailatusifah, 2011).

2.1.1 Morfologi Tumbuhan Purwoceng (*Pimpinella alpina* Molk.)

Morfologi tanaman purwoceng memiliki pohon yang membentuk roset, tangkai daun tumbuh rapat menutupi batang tanaman, seolah batang

tanaman tidak ada, jumlah tangkai daun kurang lebih sekita 46-50 buah/tanaman. Pangkal tangkai daun umumnya berwarna merah kecoklatan dan sebagian kecil (< 2%) berwarna kehijauan. Panjang tangkai daun kurang lebih 18-80 cm. Biasanya tajuk tanaman menutupi permukaan tanah yang hampir membentuk bulatan dengan diameter tajuk berkisar kurang lebih 37-90 cm (gambar, 2.1.1) (Yuhono,2006).

Purwoceng memiliki daun majemuk yang berhadapan berpasang-pasangan dan di ujung tangkai terdapat daun tunggal. Bentuk anak daun membulat dengan pinggiran bergerigi. Warna permukaan daun hijau, dan permukaan bawahnya berwarna hijau keputih-putihan. Purwoceng memiliki perakaran tunggang, akar bagian pangkal semakin bertambahnya umur tanaman maka akan semakin besar pula ukuran perakaran seolah membentuk umbi seperti bentuk perakaran ginseng dan rambut-rambut akar keluar pada ujungnya (Raharjo,2005).

Tabel 2.1.1 Deskripsi Tanaman Purwoceng

	Deskripsi
Habitus	Semak, menutup tanah, tinggi \pm 25 cm
Batang	Semu, bulat, lunak, hijau pucat
Daun	Majemuk, bentuk jantung, panjang + 3 cm, lebar \pm 2,5 cm, tepi bergerigi, ujung tumpul, pangkal bertoreh, tangkai panjang \pm 5 cm, coklat kehijauan, pertulangan menyirip, hijau
Bunga	Majemuk berbentuk payung, tangkai silinder, panjang +2 cm, kelopak bentuk tabung, hijau, benang sari putih, putik bulat, hijau, mahkota berambut, coklat
Buah	Lonjong, kecil, hijau
Biji	Lonjong, kecil, coklat
Akar	Tunggang, putih kotor



Gambar 2.1.1 a: Tanaman purwoceng, b: bunga kuncup, c: bunga mekar, d: buah, dan e: akar dari tanaman berumur 6 bulan (Darwati, 2006)

2.1.2 Manfaat dan Kandungan Senyawa Kimia Tumbuhan Purwoceng (*Pimpinella alpina* Molk.)

Setiap makhluk hidup di muka bumi seperti tumbuhan dan hewan serta seluruh isi bumi ini tidak diciptakan dalam keadaan yang sia-sia. Semuanya diciptakan dengan bekal manfaat untuk kehidupan manusia.

Pernyataan ini terdapat pada surat Asy-Syu'ara/26 ayat 7 yang menjelaskan tentang kekuasaan Allah yang telah menumbuhkan berbagai macam tumbuhan yang baik di muka bumi. Sebagaimana yang telah difirmankan dalam surat Asy-syu'ara' ayat 7 :

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمَا أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ ﴿٧﴾

Artinya :” *Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapakah banyaknya Kami tumbuhkan di bumi itu berbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik?*” (QS.Asy-Syu’ara/26:07).

Dijelaskan pula dalam surat Luqman ayat 10 bahwa Allah menciptakannya tumbuh-tumbuhan yang dapat dimanfaatkan dan dijaga kelestariannya. :

خَلَقَ السَّمَوَاتِ بِغَيْرِ عَمَدٍ تَرَوْنَهَا ۚ وَاللَّيْلِ فِي الْأَرْضِ رَواسِيَ أَنْ تَمِيدَ بِكُمْ وَبَثَّ فِيهَا مِنْ كُلِّ دَابَّةٍ وَأَنْزَلْنَا مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ .

Artinya: “*Dia menciptakan langit tanpa tiang yang kamu melihatnya dan Dia meletakkan gunung-gunung (di permukaan) bumi supaya bumi itu tidak menggoyangkan kamu; dan memperkembang biakkan padanya segala macam jenis binatang. Dan Kami turunkan air hujan dari langit, lalu Kami tumbuhkan padanya segala macam tumbuh-tumbuhan yang baik* (QS. Luqman/ 31: 10).”

Dalam ayat tersebut, Allah menjelaskan di antara bukti keagungan dan kekuasaannya adalah menurunkan air dari langit dan menumbuhkan tumbuh tumbuhan yang bermacam-macam. Dalam *Tafsir Al-Mishbah* Firman Allah diatas merupakan bagian dari hidayah-Nya kepada manusia dan binatang guna memanfaatkan buah-buahan dan tumbuh-tumbuhan itu untuk kelangsungan hidupnya, sebagaimana terdapat pula isyarat bahwa Dia member hidayah kepada langit guna menurunkan hujan, dan hidayah buat hujan agar turun tercurah, dan untuk tumguh-tumbuhan agar terus berkembang. Kata “*azwaj*” merupakan kata yang menguraikan aneka tumbuhan yaitu jenis-jenis tumbuhan yang hadir diciptakan dimuka bumi ini

seperti tumbuhan dikotil dan monokotil. Tumbuhan merupakan salah satu bahan pokok yang digunakan manusia untuk berbagai macam kepentingan, misalnya untuk bahan pangan, sandang, obat dan lain sebagainya. Semua itu dimanfaatkan untuk kelangsungan hidup manusia agar manusia tetap hidup di bumi Allah.

Satu diantara tumbuhan yang memiliki manfaat bagi kehidupan manusia adalah purwoceng. Purwoceng mengandung berbagai senyawa metabolit sekunder yaitu turunan kumarin, sterol, saponin, dan alkaloid. Kelompok furanokumarin seperti isobergaptin dan sphondin (Sidik, 2004) serta diduga mengandung stigmasterol (Suzery *et al.* 2004) dan senyawa turunan kumarin seperti bergaptin, xanthotoksin, marmesin, 6.8 dimetoksi umbeliferon. Saponin dan sterol golongan triterpenoid yaitu senyawa yang memiliki kerangka karbon berasal dari 6 satuan isoprene dan secara biosintesis diturunkan dari hidrokarbon C₃₀ asiklik skualena, (Vickery, 1981 dalam Darwati, 2007)

Berdasarkan hasil penelitian Darwati (2007) menunjukkan bahwa seluruh bagian tanaman (akar, daun dan bunga) berguna sebagai obat, dan mengandung turunan senyawa sterol, yaitu sitosterol, stigmasterol dan turunan senyawa furanokumarin yaitu bergaptin dan vitamin E. Kandungan dari komponen kimia tersebut begitu kompaknya dengan fungsi yang saling mengisi dimana sitosterol dan stigmasterol berfungsi sebagai afrodisiak atau meningkatkan vitalitas seks bagi kaum pria.

Purwoceng adalah salah satu tanaman yang memiliki fungsi sebagai obat yang merupakan tanaman khas jawa tengah, dimana tumbuhan ini dapat meningkatkan vitalitas (afrodisiak) telah diteliti dan telah diformulasikan yang kemudian telah diusulkan. Pada umumnya tumbuhan yang mempunyai khasiat sebagai afrodisiak mengandung senyawa tertentu misalnya saponin, alkaloid, senyawa yang berkaitan dengan steroid dan senyawa-senyawa lain yang berkhasiat sebagai penguat tubuh dan pelancar peredaran darah (Darwati, 2007).

Tabel 2.1.2 Kandungan Fitokimia pada Purwoceng

Senyawa aktif	Efek
Lomonena (terkandung dalam seluruh bagian tanaman)	Menghambat pertumbuhan jamur <i>Candida albicans</i> penyebab keputihan, merangsang peristaltic
Anisketone (terkandung dalam buah)	Merangsang dan menambah semangat, dan pereda lelah
Asam kafeat (Terkandung dalam seluruh bagian tanaman)	Merangsang semangat, merangsang aktifitas saraf pusat, merangsang keluarnya prostaglandin, dan menghambat keluarnya histamine
Dianethole (terkandung dalam seluruh bagian tanaman)	Merangsang hormon estrogen
Hydroquinone (terkandung dalam seluruh bagian tanaman)	Merangsang ereksi, mengurangi sekresi cairan pada liang vagina, anti pendarahan diluar haid, merangsang semangat, menaikkan tekanan darah
Isoorietin (terkandung dalam seluruh bagian tanaman)	Menambah produksi sperma
Phlellandrene (terkandung dalam seluruh bagian tanaman)	Memacu ereksi, sebagai bahan pewangi dan pengharum
Squalena (terkandung dalam seluruh bagian tanaman)	Merangsang semangat, melancarkan transfer oksigen dalam darah
Stigmasterol (terkandung dalam seluruh bagian tanaman)	Merangsang hormon estrogen, merangsang terjadinya proses ovulasi, bahan baku pembuatan hormon steroid

Sumber: Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik (2011)

2.2 Kultur Jaringan Tanaman

2.2.1 Pengertian Kultur Jaringan

Kultur jaringan merupakan suatu metode untuk mengisolasi bagian dari tanaman seperti protoplasma, sel, sekelompok sel, jaringan dan organ, serta menumbuhkannya dalam kondisi yang aseptik, sehingga bagian-bagian tersebut dapat memperbanyak diri dan beregenerasi menjadi tanaman lengkap kembali. Pada mulanya, orientasi teknik kultur jaringan hanya pada pembuktian teori totipotensi sel. Kemudian hal ini menjadi sarana penelitian di bidang fisiologi tanaman dan aspek-aspek biokimia tanaman (Gunawan, 1987).

Di dalam Surat Al An'am/06 ayat 95 dapat di jadikan dasar dalam proses kultur jaringan yaitu Allah menjelaskan bagaimana Allah telah mengeluarkan sesuatu yang hidup dari yang mati.

﴿ إِنَّ اللَّهَ فَالِقُ الْحَبِّ وَالنَّوَىٰ ۚ يُخْرِجُ الْحَيَّ مِنَ الْمَيِّتِ وَمُخْرِجُ الْمَيِّتِ مِنَ الْحَيِّ ۚ ذَٰلِكُمْ اللَّهُ فَانِي تُوَفُّوْنَ ۗ ﴾

Artinya: “*Sesungguhnya Allah menumbuhkan butir tumbuh-tumbuhan dan biji buah-buahan. Dia mengeluarkan yang hidup dari yang mati dan mengeluarkan yang mati dari yang hidup. (yang memiliki sifat-sifat) demikian ialah Allah, Maka mengapa kamu masih berpaling?*” (QS.Al-An'am/06: 95).

Pada ayat di atas tersirat makna bahwa manusia dapat terinspirasi dari ayat di atas untuk berusaha menumbuhkan sesuatu yang hidup dari yang mati melalui tehnik kultur jaringan. Contohnya yaitu manusia dapat menanam bagian dari tumbuhan seperti kuncup daun, atau petiol pada media

agar yang merupakan benda mati untuk dapat menghasilkan individu baru. Menurut *Al-Maraghi* (1992), kandungan ayat diatas menjelaskan bahwa “Allah menumbuhkan apa yang kita tanam, berupa benih tanaman yang dituai, dan biji buah, serta membelah dengan kekuasaan dan perhitungannya, dengan menghubungkan sebab musabab, seperti menjadikan benih biji dalam tanah, serta menyirami tanah dengan air”.

Kata **يُخْرِجُ** yang berarti mengeluarkan memiliki makna tersendiri bagi tumbuhan. Jika diperhatikan proses perkembangan tumbuhan secara garis besar maka mengeluarkan memiliki arti bahwasanya Allah menumbuhkan tumbuh-tumbuhan tersebut di atas tanah baik di mulai dari benih, biji ataupun tunas sehingga menjadi tumbuh-tumbuhan yang bermacam-macam jenisnya.

Menurut *Al-Maraghi* ayat ini menunjukkan kepada kesempurnaan kekuasaan, keindahan dan kebijaksanaan Allah SWT yang tergambar melalui tumbuhan. Para ahli genetika mengungkapkan bahwa “pada asal makhluk hidup ada kehidupan, setiap yang tumbuh, dari jenis biji maupun benih, mempunyai kehidupan yang tersimpan. Dia (Allah) mengeluarkan tumbuh-tumbuhan yang segar dari biji yang kering, dan mengeluarkan yang kering dari tumbuh-tumbuhan yang hidup dan tumbuh.

Allah SWT menjelaskan pula dalam surat At-Thaha ayat 53:

الَّذِي جَعَلَ لَكُمُ الْأَرْضَ مَهْدًا وَسَلَكَ لَكُمْ فِيهَا سُبُلًا وَأَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً

فَأَخْرَجْنَا بِهِ أَزْوَاجًا مِّنْ نَّبَاتٍ شَتَّى ﴿٥٣﴾

Artinya: “yang telah menjadikan bagimu bumi sebagai hamparan dan yang telah menjadikan bagimu di bumi itu jalan-jalan, dan menurunkan dari langit air hujan. Maka Kami tumbuhkan dengan air hujan itu berjenis-jenis dari tumbuh-tumbuhan yang bermacam-macam” (QS.At-Thaha/20:53).

Ayat diatas secara umum menjelaskan tentang berbagai macam jenis tumbuhan yang hidup dihamparan bumi. Kata *أَزْوَاجًا* dapat memiliki arti berpasang-pasangan, jadi didalam kultur jaringan kata diartikan sebagai jaringan yang bermacam-macam dan bersatu dan berpasang-pasangan untuk dapat membentuk suatu fungsi, bahkan dapat membentuk organ tumbuhan yang baru salah satunya adalah kalus yang merupakan massa sel yang terdiri dari sel yang membentuk jaringan-jaringan dan belum mengalami deferensiasi hingga dapat membentuk tanaman baru. Selain itu kata “*azwaj*” dapat juga diartikan sebagai pasangan yang dimiliki oleh tumbuhan dengan demikian ayat ini mengisyaratkan bahwa tumbuhan memiliki pasangan untuk dapat berkembangbiak.

Teknik kultur jaringan tumbuhan terdiri dari beberapa tahapan yang secara umum terdiri dari: tahap persiapan, tahap inisiasi kultur, tahap multiplikasi tunas, tahap pemanjangan tunas, induksi akar dan perkembangan akar dan tahap terakhir berupa pemindahan ke rumah kaca (aklimatisasi) (Alitalia,2008).

2.2.2 Faktor- Faktor Yang Mempengaruhi Kultur jaringan

Faktor-faktor yang berpengaruh terhadap pertumbuhan dan perkembangan *in vitro* adalah eksplan, media tanam, kondisi fisik media, Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) dan lingkungan tumbuh (Alitalia,2008):

1. Eksplan

Eksplan merupakan sebutan bagi bahan tanaman yang dikulturkan. Menurut Harjadi (1989) bagian tanaman yang dijadikan sebagai eksplan mencakup ujung pucuk, irisan-irisan batang, daun, daun bunga, daun keping biji, akar, buah, embrio, meristem pucuk apikal (yang betul-betul merupakan titik tumbuh) dan jaringan nuselar (Alitalia,2008).

Menurut Gunawan (1987), eksplan harus diusahakan agar dalam keadaan aseptik melalui prosedur sterilisasi dengan berbagai bahan kimia. Melalui eksplan yang aseptik kemudian diperoleh kultur yang *axenik* yaitu kultur dengan hanya satu macam organisme yang diinginkan.

Eksplan yang ditanam pada media tumbuh yang tepat dapat beregenerasi melalui proses yang disebut organogenesis atau embriogenesis. Organogenesis merupakan suatu proses terbentuknya organ-organ seperti pucuk dan akar. Sedangkan embriogenesis merupakan suatu proses terbentuknya embrio somatik. Embrio yang terbentuk ini bukan dari zigot, melainkan dari sel biasa dari tubuh tanaman (Gunawan, 1987).

2. Media

Keberhasilan dalam penggunaan metode kultur jaringan sangat bergantung pada media yang digunakan. Media ini tidak hanya menyediakan unsur hara (makro dan mikro) tetapi juga karbohidrat (gula) untuk menggantikan karbon yang biasanya didapat dari atmosfer melalui fotosintesis. Hasil yang lebih baik akan kita peroleh, bila ke dalam media

tersebut ditambahkan vitamin, asam amino dan zat pengatur tumbuh (Gunawan, 1987).

Banyak formulasi medium yang ada, masing-masing berbeda dalam hal kuantitas maupun kualitas komponennya. Salah satu formulasi yang banyak digunakan adalah Murashige & Skoog (MS) yang telah ditemukan dan dipublikasi oleh Toshio Murashige dan Skoog pada tahun 1962. Formulasi dasar mineral dari MS ternyata dapat digunakan untuk sejumlah besar spesies tanaman dalam perbanyakan *in vitro*.

Umumnya media kultur jaringan tersusun atas komposisi hara makro, hara mikro, vitamin, gula, asam amino dan N-organik, persenyawaan kompleks alamiah (air kelapa, ekstrak ragi, juice tomat, dsb), buffer, arang aktif, zat pengatur tumbuh (terutama auksin dan sitokinin) dan bahan pemat. Faktor lain yang tidak kalah penting dalam teknik kultur jaringan adalah pengaturan pH media. Tingkat kemasaman media harus diatur supaya tidak mengganggu fungsi membran sel dan pH sitoplasma. Sel-sel tanaman membutuhkan pH yang sedikit asam berkisar antara 5.5-5.8 (Alitalia, 2008).

3. ZPT

Zat pengatur tumbuh (ZPT) didefinisikan sebagai senyawa organik bukan nutrisi yang aktif dalam jumlah kecil (10⁻⁶-10⁻⁵ mM) yang disintesis pada bagian tertentu tanaman dan pada umumnya diangkut ke bagian lain tanaman dimana zat tersebut menimbulkan tanggapan secara biokimia, fisiologis dan morfologis (Wattimena, 1988). Dua golongan zat

pengatur tumbuh yang penting dalam kultur jaringan yaitu auksin dan sitokinin. Zat pengatur tumbuh ini mempengaruhi pertumbuhan dan morfogenesis dalam kultur sel dan organ. Interaksi dan perimbangan antara zat pengatur tumbuh yang diberikan dalam media dan yang diproduksi oleh sel secara endogen menentukan arah perkembangan suatu kultur (Gunawan, 1987).

ZPT bertindak secara sinergis dalam tindakannya sebagai penyebab respons, seperti yang dinyatakan Gardner *et al.* (1991). Dalam kultur jaringan, ada 2 (dua) golongan ZPT yang sangat penting, yaitu auksin dan sitokinin. ZPT tersebut mempengaruhi pertumbuhan dan morfogenesis dalam kultur sel, kultur jaringan, dan kultur organ (Karjadi 1996).

Auksin merupakan salah satu zat pengatur tumbuh tanaman yang aktifasinya dapat merangsang atau mendorong pengembangan sel. Di dalam IAA (*Indol Asetat acid*) diidentifikasi sebagai auksin aktif didalam tumbuhan yang diproduksi di dalam jaringan meristematik yang aktif seperti tunas, sedangkan IBA (*Indol Butirat Acid*) dan NAA (*Naftalen asetat asid*) merupakan auksin sintetik (Hoesen,2000).

Auksin banyak digunakan secara luas pada kultur jaringan dalam merangsang pertumbuhan kalus, suspensi sel dan organ (Gunawan, 1987). Bentuk-bentuk auksin yang biasa ditambahkan ke dalam media kultur adalah 2,4-D (2,4Dichlorophenoxy Asetic Acid), IBA (Indole Butyric

Acid), NAA(Naphthalene Asetic Acid) dan IAA (Indole-3-Acetic Acid). Auksin yang secara alami terdapat dalam tumbuhan adalah IAA.

Sitokinin merupakan ZPT yang penting dalam pengaturan pembelahan sel dan morfogenesis. Beberapa macam sitokinin merupakan sitokinin alami (misal: kinetin, zeatin) dan beberapa lainnya merupakan sitokinin sintetik. Sitokinin alami dihasilkan pada jaringan yang tumbuh aktif terutama pada akar, embrio dan buah. Sitokinin yang diproduksi di akar selanjutnya diangkut oleh xilem menuju sel-sel target pada batang.

4. Lingkungan Tumbuh

Cahaya dalam kultur jaringan berguna untuk mengatur proses-proses morfogenik tertentu seperti pembentukan pucuk dan akar, dan tidak untuk fotosintesis karena sumber energi bagi eksplan telah disediakan oleh sukrosa. Cahaya juga penting dalam pengendalian perkembangan eksplan dan unsur-unsur cahaya yang perlu diperhatikan adalah kualitas cahaya, panjang penyinaran dan intensitas cahaya. Temperatur ruang kultur juga menentukan respon fisiologi kultur dan kecepatan pertumbuhannya. Dari hasil penelitian juga dijelaskan bahwa fotosintesis jaringan sebagian besar jenis tanaman secara *in vitro* sangat rendah dan sebagian besar tergantung pada suplai sukrosa dari luar (medium kultur). Dalam hal ini cahaya sangat penting untuk fotomorfogenesis. Fotomorfogenesis merupakan proses menginduksi perkembangan suatu tanaman dan tidak melibatkan energi cahaya dalam jumlah besar. Reaksi fotomorfogenesis dibagi menurut tipe

bagian spektrum yang menghasilkan respon. Respon yang utama adalah yang diinduksi oleh spektrum cahaya merah atau biru (Alitalia,2008).

2.3 Teknik Kultur Kalus Untuk Produksi Metabolit Sekunder

Kalus merupakan masa sel yang tidak berdeferensiasi atau belum terorganisir terbentuk di sekitar luka atau akibat kerja hormon auksin dan sitokinin. Kalus tersusun atas sel-sel parenkim (George dan Sherington,1984 ; Pierik, 1987 dalam Darwati,2007).

Berdasarkan perubahan ukuran sel, metabolisme dan penampakan kalus, proses perubahannya dari eksplan menjadi kalus dapat dibagi menjadi tiga tahap yaitu induksi, pembelahan, dan deferensiasi. Pada tahap induksi sel siap untuk membelah, metabolisme menjadi aktif dan ukuran sel tetap konstan. Tahap pembelahan, sel aktif membelah atau bersifat meristematik dan terjadi penurunan ukuran sel. Akhir pertumbuhan kalus ditandai dengan peningkatan deferensiasi dicirikan dengan pembesaran sel, sel menjadi bervakuola dan penurunan laju pembelahan (Alitalia,2008).

Pertumbuhan kalus dapat digambarkan dalam bentuk kurva sigmoid, biasanya terdiri dari lima fase yaitu (1) lag fase, sel siap untuk membelah. (2) Periode pertumbuhan eksponensial, pembelahan sel secara maksimal. (3) Periode pertumbuhan linier, pembelahan sel menurun dan pembesaran sel. (4) Periode penurunan kecepatan tumbuh. (5) Stasioner atau periode tidak ada pertumbuhan, jumlah sel konstan (Smith,2000). Metabolit sekunder pada umumnya meningkat pada fase stasioner. Hal ini dimungkinkan karena adanya

peningkatan vakuola sel atau akumulasi. Pada fase stasioner pertumbuhan terhenti dan terjadi kematian sel, hal ini karena sejumlah nutrisi telah berkurang atau terjadi akumulasi senyawa toksik yang dikeluarkan kalus ke dalam medium. Pada fase ini harus dilakukan subkultur agar kalus tetap hidup (Darwati,2007).

2.3.1 Tekstur Kalus

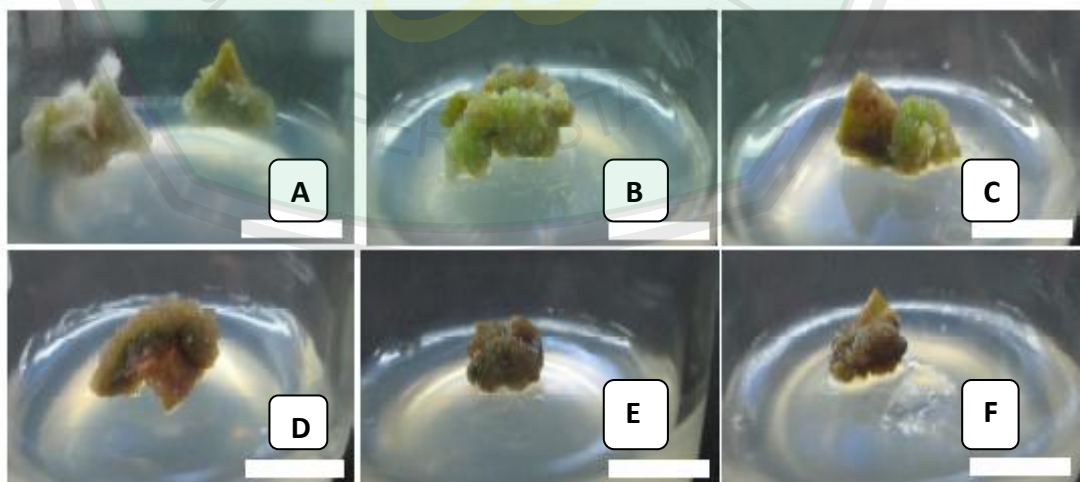
Bentuk kalus dapat dibedakan berdasarkan tekstur dan sifat fisik. Berdasarkan tekstur kalus dibedakan atas kalus kompak dan kalus friable (Gambar 2.3.1). Kalus kompak yaitu kalus yang terbentuk dari sekumpulan sel yang kuat. Sedangkan kalus yang terdiri dari sel-sel lepas disebut kalus friabel. Kalus friabel sangat cocok digunakan untuk pertumbuhan sebagai kalus suspense. Kalus kompak dapat menjadi kalus friabel akan tetapi kalus friabel tidak dapat menjadi kalus kompak. Kalus friabel dan kalus kompak mempunyai komposisi kimia yang berbeda. Kalus kompak mempunyai kandungan polisakarida dengan pektin dan hemiselulos. Kandungan selulosa yang tinggi meningkatkan sel lebih rigid. Pektin yang tinggi sel lebih kuat dan dapat menahan fragmentasi (Alitalia,2008).



Gambar 2.3.1 Tekstur kalus (A) tekstur kalus remah, (B) tekstur kalus kompak (Zulkarnain, 2008)

2.3.2 Warna Kalus

Warna kalus juga merupakan indikator dalam pertumbuhan kalus. Kalus yang baik adalah berwarna putih yang menandakan kalus dalam keadaan aktif membelah. Perubahan warna kalus dapat disebabkan oleh beberapa hal diantaranya menurut Hendaryono dan Wijayani (1994) menerangkan bahwa kondisi perubahan warna kalus dapat disebabkan oleh adanya pigmentasi, pengaruh cahaya, dan bagian tanaman yang dijadikan sebagai sumber eksplan. Eksplan yang cenderung berwarna kecoklatan disebabkan oleh kondisi eksplan yang secara internal mempunyai kandungan fenol tinggi. Fenol akan teroksidasi menjadi kuinon fenolik oleh pengaruh cahaya. Menurut Fatmawati (2008), warna kalus mengindikasikan keberadaan klorofil dalam jaringan, semakin hijau warna kalus semakin banyak pula kandungan klorofilnya (Gambar 2.3.2).



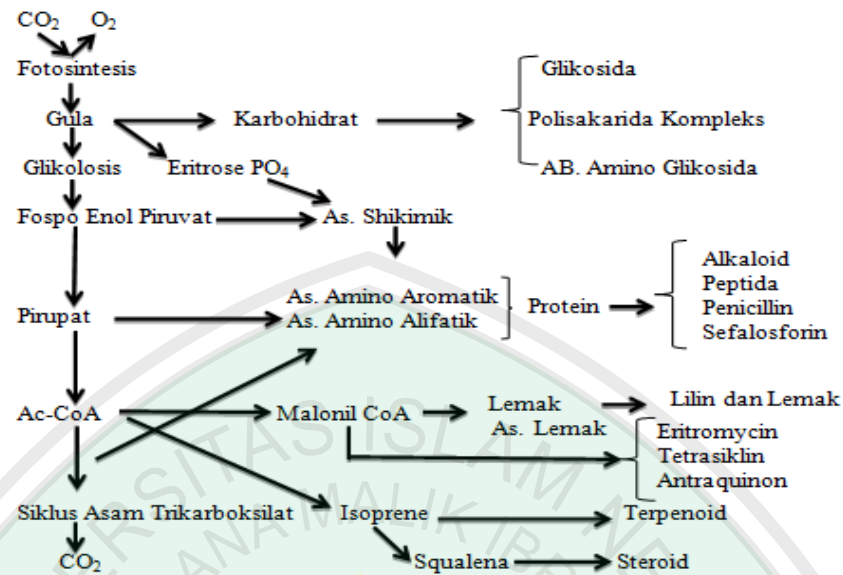
Gambar 2.3.2. Contoh visualisasi warna kalus eksplan kotiledon tanaman *Helianthus annuus* L. A. Hijau bening, B. Hijau kekuningan, C. Hijau kecoklatan, D. Coklat, E. Coklat+, F. Coklat ++ (Lutviana, 2012).

2.4 Metabolit primer

Biosintesis merupakan proses pembentukan suatu metabolit (produk metabolisme) dari molekul yang sederhana hingga menjadi molekul yang lebih kompleks yang terjadi pada organisme hidup (Neumann *et al.* 1985). Metabolisme pada makhluk hidup dapat dibagi menjadi metabolisme primer dan sekunder. Metabolisme primer menghasilkan metabolit primer sedangkan metabolisme sekunder menghasilkan metabolit sekunder (Sholihah, 2011).

Metabolisme primer pada tumbuhan, seperti respirasi dan fotosintesis, merupakan proses yang esensial bagi kehidupan tumbuhan. Tanpa adanya metabolisme primer, suatu organisme akan terganggu pertumbuhan, perkembangan, serta reproduksinya, dan akhirnya mati. Berbeda dengan metabolisme primer, metabolisme sekunder merupakan proses yang tidak esensial bagi kehidupan organisme. Tidak ada atau hilangnya metabolit sekunder tidak menyebabkan kematian secara langsung bagi tumbuhan, tapi dapat menyebabkan berkurangnya ketahanan hidup tumbuhan secara tidak langsung (misalnya dari serangan herbivore dan hama), ketahanan terhadap penyakit, estetika, atau bahkan tidak memberikan efek sama sekali bagi tumbuhan tersebut (Sholihah, 2011).

Pada fase pertumbuhan, tumbuhan utamanya memproduksi metabolit primer, sedangkan metabolit sekunder belum atau hanya sedikit diproduksi. Sedangkan metabolisme sekunder terjadi pada saat sel dalam tahap diferensiasi menjadi sel yang lebih terspesialisasi (fase stasioner). Berikut ini adalah gambar skematik jalur metabolit primer (Najib, 2006):



Gambar 2.4.1 Skema biosintesis metabolit primer
(Sastrohamidjojo, 1996)

2.5 Metabolit Sekunder

Metabolit sekunder merupakan senyawa yang disintesis tanaman yang digolongkan menjadi lima yaitu glikosida, terpenoid, fenol, flavanoid, dan alkaloid. Senyawa-senyawa tersebut bermanfaat bagi tanaman itu sendiri maupun bagi serangga, hewan, dan manusia. Fungsi senyawa metabolit sekunder adalah sebagai sistem pertahanan terhadap virus, bakteri, jamur, serangga, sebagai pertahanan terhadap tanaman lain melalui allelopati, sebagai antraktan untuk membantu serangga polinasi, dan Sebagai obat, *food additive*, flavor, pewarna dan peptisida nabati (Darwati, 2007).

Produk senyawa metabolit sekunder pada tanaman mempunyai variabilitas yang tinggi karena sangat tergantung dengan kondisi iklim, hama dan penyakit serta kondisi fisiologis tanaman tersebut. Senyawa dari tanaman tersebut. Senyawa dari tanaman sangat kompleks sehingga terkadang untuk pembuatannya secara sintesis sangat sulit dan mahal. Oleh karena itu sejumlah

produk alami mempunyai nilai ekonomi tinggi masih diekstrak dari tanaman. Akan tetapi keperluan dalam skala besar masih sulit terpenuhi karena senyawa alami diproduksi tanaman dalam jumlah sedikit dan pada jaringan yang spesifik seperti akar. Untuk dapat memenuhi kebutuhan yang tinggi diperlukan penanaman dalam skala luas agar diperoleh akar yang banyak (Darwati,2007).

Teknik kultur *in vitro* pada beberapa tanaman yang telah digunakan untuk memproduksi metabolit sekunder dalam skala industri. Keuntungan menggunakan teknik kultur *in vitro* antara lain senyawa sekunder yang dihasilkan dapat diproduksi pada lingkungan yang terkendali, bebas dari daerah lingkungan, bebas dari hama, dapat menghasilkan senyawa yang spesifik, produksi dapat dikendalikan sesuai dengan kebutuhan, kualitas produksinya dapat lebih konsisten serta lahan yang dibutuhkan tidak luas (Ernawati,1992).

Menurut Dalimoenthe (1987) kultur *in vitro* untuk metabolit sekunder sering tidak berhasil. Hal ini berkaitan dengan ada dan tidaknya akumulasi metabolit sekunder yang ditentukan oleh pertumbuhan dan deferensiasi sel dari tanaman tersebut. Kendala lain seperti cahaya, zat pengatur tumbuh, ketersediaan precursor dan kendala biologis dari sel atau jaringan juga berperan dalam proses metabolit sekunder. Pembentukan metabolit sekunder melalui kultur *in vitro* dapat dikategorikan menjadi 4 yaitu:

1. Senyawa yang membentuk tidak terkait pada deferensiasi sel tertentu, senyawa ini kadang terdapat pada kalus

2. Senyawa yang biasanya terkait dengan deferensiasi sel tertentu
3. Senyawa yang distribusinya sangat sedikit terkandung di dalam tanaman tetapi bagian yang membentuk dan mengakumulasi tidak terlihat pada sel tertentu
4. Senyawa ini disintesis dan diakumulasi oleh sel tertentu dengan sel yang terkait (Darwati,2007)

Kultur *in vitro* pada media yang optimum, pada umumnya produksi metabolit sekunder terjadi pada fase akhir stasioner. Pertumbuhan yang terhambat sering diasosiasikan dengan sitodiferensiasi dan induksi enzim untuk metabolit sekunder. Modifikasi media pertumbuhan untuk produksi metabolit sekunder antara lain: Mengurangi zat pengatur tumbuh, mengurangi konsentrasi fosfat, meningkatkan gula atau alternatif lain sebagai sumber C/N (Bhojwani dan Razdan, 1996). Peningkatan metabolit sekunder dengan memanipulasi media kultur yaitu member prekursor dan ekstrak jaringan (Darwati, 2007)

Senyawa metabolit sekunder dapat di kelompokkan menjadi beberapa kelompok antara lain Alkaloid, terpenoid, steroid, fenolik, dan glukosinolat serta sianogenik (Kazebara, 2012). Alkaloid adalah senyawa yang mengandung atom nitrogen yang tersebar secara terbatas pada tumbuhan. Alkaloid kebanyakan dibentuk dari asam amino seperti lisin, tirosin, triptofan, histidin dan ornitin. Sebagai contoh, nikotin dibentuk dari ornitin dan asam nikotinat. Diantaranya adalah kelompok alkaloid benzil isoquinon, seperti: papaverin, berberin, tubokurarin dan morfin.

Terpenoid adalah komponen tumbuhan yang mempunyai bau dan dapat diisolasi dari bahan nabati dengan penyulingan disebut sebagai minyak atsiri. Kelompok ini merupakan derivat dari asam mevalonat atau prekursor lain yang serupa dan memiliki keragaman struktur yang sangat banyak. Struktur terpenoid merupakan satu unit isopren (C_5H_8) atau gabungan lebih dari satu unit isopren, sehingga pengelompokannya didasarkan pada jumlah unit isopren penyusunnya. Sebagian besar terpenoid mempunyai kerangka karbon yang dibangun oleh dua atau lebih unit C_5 yang disebut unit isopren. Unit C_5 ini dinamakan demikian karena kerangka karbonnya sama seperti senyawa isoprene.

Steroid terdiri atas beberapa kelompok senyawa dan penegelompokan ini didasarkan pada efek fisiologis yang diberikan oleh masing-masing senyawa. Kelompok-kelompok itu adalah sterol, asam- asam empedu, hormon seks, hormon adrenokortikoid, aglikon kardiak dan sapogenin. Biosintesa steroid adalah sama bagi semua steroid alam yaitu pengubahan asam asetat melalui asam mevalonat dan skualen (suatu triterpenoid) menjadi lanosterol dan sikloartenol. Fenolik adalah senyawa yang banyak ditemukan pada tumbuhan. Fenolik memiliki cincin aromatik dengan satu atau lebih gugus hidroksi (OH^-) dan gugus-gugus lain penyertanya. Senyawa ini diberi nama berdasarkan nama senyawa induknya, fenol. Senyawa fenol kebanyakan memiliki gugus hidroksi lebih dari satu sehingga disebut sebagai polifenol. Kerangka penyusun flavonoid adalah $C_6-C_3-C_6$. Inti flavonoid biasanya

berikatan dengan gugusan gula sehingga membentuk glikosida yang larut dalam air. Pada tumbuhan, flavonoid biasanya disimpan dalam vakuola sel.

Glukosinolat merupakan metabolit sekunder yang dibentuk dari beberapa asam amino dan terdapat secara umum pada Cruciferae (Brassicaceae). Glukosinolat dikelompokkan menjadi setidaknya 3 kelompok, yakni: (1) glukosinolat alifatik (contoh: sinigrin), terbentuk dari asam amino alifatik (biasanya metionin), (2) glukosinolat aromatik (contoh: sinalbin), terbentuk dari asam amino aromatik (fenilalanin atau tirosin) dan (3) glukosinolat indol, yang terbentuk dari asam amino indol (triptofan).

Selain itu metabolit sekunder ada juga yang disebut dengan fitoaleksin. Fitoaleksin adalah zat toksin yang dihasilkan oleh tanaman dalam jumlah yang cukup hanya setelah dirangsang oleh berbagai mikroorganisme patogenik atau oleh kerusakan mekanis dan kimia. Fitoaleksin dihasilkan oleh sel sehat yang berdekatan dengan sel-sel rusak dan nekrotik sebagai jawaban terhadap zat yang berdifusi dari sel yang rusak. Fitoaleksin terakumulasi mengelilingi jaringan nekrosis yang rentan dan resisten. Ketahanan terjadi apabila satu jenis fitoaleksin atau lebih mencapai konsentrasi yang cukup untuk mencegah patogen berkembang (Agrios, 1997 dalam hardiansyah, *et.al.* 2011).

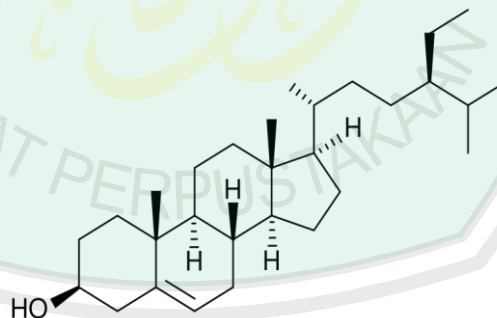
Fitoaleksin merupakan senyawa kimia yang berasal dari derivat flavanoid dan isoflavon, turunan sederhana dari fenilpropanoid, dan derivat dari sesquiterpens. Fitoaleksin berasal dari biosintesis metabolit pimer yaitu seperti 6-methoxymellein dan sesquiterpens serta derivat dari asam melonat dan asam mevalonat. Fitoaleksin dapat terjadi dari dua jalur yaitu jalur asam

mevalonat dan jalur biosintesa deoksisilulusadifosfat. Biosintesis fitoaleksin menggunakan prekursor yang berasal dari jalur metabolit sekunder (Hammerschmidt, 1999).

2.6 Biosintesis Senyawa Stigmasterol dan Sitosterol

2.6.1 Senyawa Sitosterol

β -Sitosterol merupakan senyawa turunan dari steroid yang memiliki kerangka dasar berupa cincin siklopentana perhidrofenantren (Gambar. 2.6.1). Sitosterol termasuk dalam golongan senyawa fitosterol yang merupakan senyawa kolesterol yang didapatkan dari tumbuhan. β -Sitosterol memiliki bentuk seperti kristal putih berbentuk jarum dengan titik leleh 126°C (Gaffar, 2010). Senyawa ini tidak berpendar di bawah sinar UV (Jawahir, 2009).



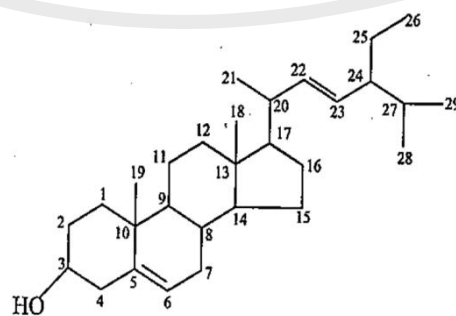
Gambar 2.6.1 Struktur Kimia Sitosterol
(Jawahir, 2009)

Sitosterol merupakan sterol nabati atau fitosterol. Sterol ini berfungsi untuk menghambat absorpsi kolestrol dari usus, meningkatkan ekskresi garam-garam empedu, atau menghindarkan esterifikasi kolesterol dalam mukosa intestinal. Fitosterol juga dapat menghambat sintesis

kolesterol dengan memodifikasi aktivitas enzim hepatic acetyl-Coa carboxylase dan kolesterol 7- lzydroxylase.

2.6.2 Senyawa Stigmasterol

Stigmasterol merupakan salah satu dari kelompok sterol, atau pitosterol, yang mencakup beta-sitosterol, campesterol, ergosterol (provitamin D₂), brassicasterol, delta-7-stigmasterol dan delta-7- avenasterol, yang secara kimiawi mirip dengan hewan kolesterol. Pitosterol tidak larut dalam air tetapi larut dalam pelarut organik dan paling mengandung satu gugus alkohol fungsional. Stigmasterol adalah sterol tak jenuh dari tanaman yang dapat dijumpai pada kedelai, kacang calabar, dan di sejumlah tanaman obat, termasuk ramuan Cina *japonicus Ophiopogon* (Mai pria dong) dan Ginseng Amerika. Stigmasterol juga ditemukan dalam berbagai sayuran, kacang-kacangan, kacang-kacangan, biji. Penelitian telah menunjukkan bahwa stigmasterol mungkin berguna dalam pencegahan tertentu kanker, termasuk ovarium, prostat, payudara, dan kanker usus besar. Stigmasterol merupakan steroida dengan jumlah atom karbon 29. Struktrul dari stimasterol adalah sebagai berikut (Gambar 2.6.2) (Susidarti, 2007):

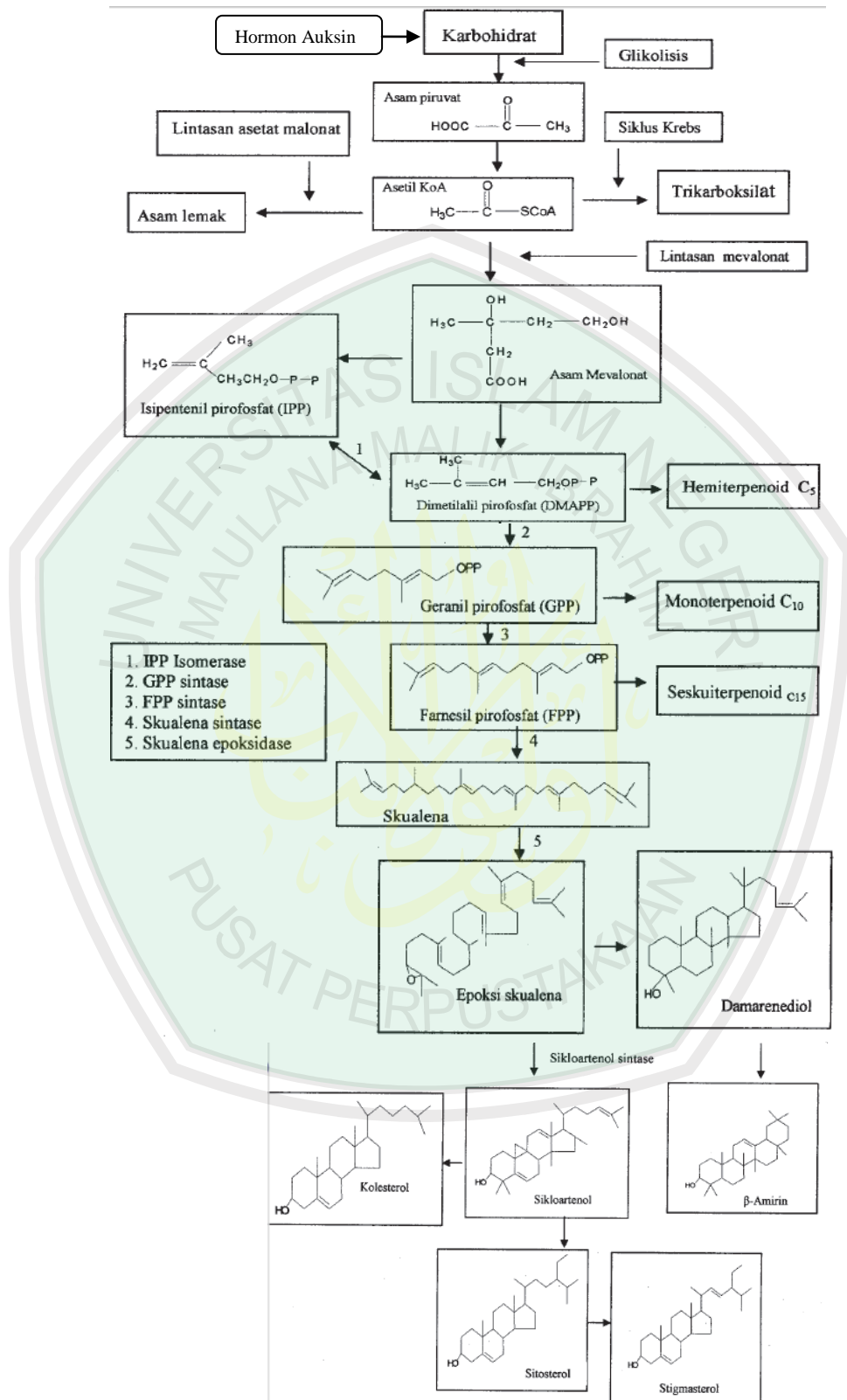


Gambar 2.6.2. Struktur Kimia Stigmasterol (Susidarti,2007)

2.6.3 Biosintesis Senyawa Sitosterol dan Stigmasterol

Pada tanaman purwoceng senyawa yang dihasilkan adalah senyawa sitosterol dan senyawa stigmasterol. Senyawa tersebut terbentuk dari lintasan mevalonat. Biosintesis senyawa sitosterol dan stigmasterol ini dimulai dari karbohidrat yang kemudian melewati dua lintasan yaitu lintasan mevalonat dan lintasan skualena hingga membentuk senyawa epoksi skualena yang merupakan percabangan untuk membentuk senyawa sterol dan triterpen saponin. Skema biosintesis sitosterol dan stigmasterol adalah sebagai berikut:





Gambar 2.6.3 Biosintesis sitosterol dan stigmasterol (Darwati,2008)

Gambar 2.6.3 menerangkan bahwa biosintesis senyawa stigmasterol dan sitosterol dapat terjadi melalui lintasan asam mevalonat sehingga membentuk skualena yang melibatkan beberapa enzim diantaranya IPP isomerase, GPP sintetase, FPP sintetase, skualena sintetase, dan skualena epoksidase sehingga dapat membentuk senyawa stigmasterol dan sitosterol melalui sikloartenol. Jika dilihat dari skema metabolit primer pada gambar 2.4.1 dapat diketahui bahwa stigmasterol dan sitosterol merupakan senyawa dari golongan steroid, dapat dilihat juga bahwa steroid dan terpenoid merupakan turunan dari isoprene melalui Asetil CoA sehingga steroid dan terpenoid melalui lintasan biosintesa yang sama.

Senyawa terpen adalah komponen kimia fundamental yang dibutuhkan oleh makhluk hidup dalam mempertahankan kehidupannya dan dalam perkembangbiakannya. Pada sel-sel makhluk hidup, steroid yang terbentuk melalui jalur biosintesis isoprena merupakan komponen pembentuk membran sel yang sangat vital (Agusta, 2006).

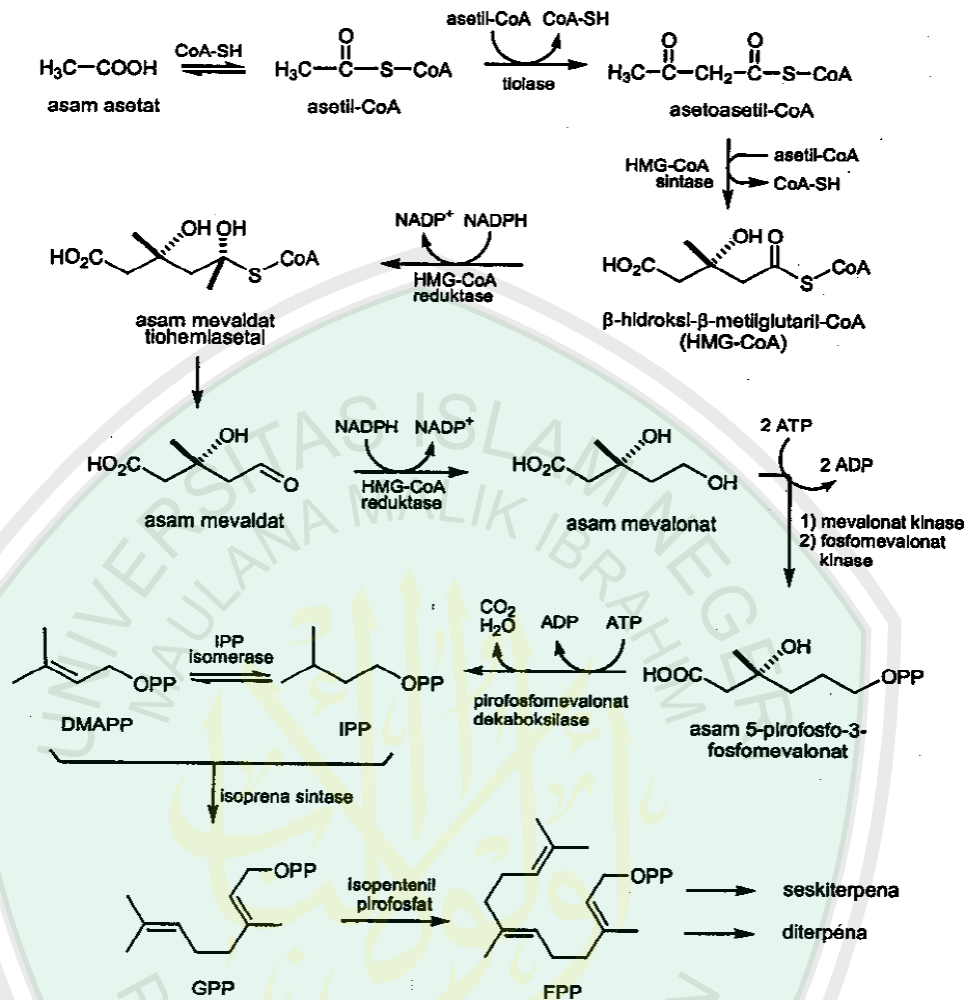
Seluruh senyawa terpenoid yang ada di alam dibangun dari kondensasi unit isoprena aktif yang disebut dengan isopentenil pirofosfat (IPP) dan dimetilalanin pirofosfat (DMAPP). Biosintesa IPP dan DMAPP secara luas terjadi hanya lewat jalur mevalonat pada semua makhluk hidup. Setelah melewati beberapa penelitian dijelaskan bahwa adanya dualisme pada jalur biosintesa isoprena pada makhluk hidup yaitu jalur asam mevalonat dan jalur non asam mevalonat yaitu dengan jalur biosintesa deoksisilulosa difosfat (Agusta, 2006).

Pada umumnya setiap individu hanya memiliki satu jenis jalur biosintesa isoprene antara lain via mevalonat atau via DXP. Akan tetapi pada tumbuhan

terdapat keunikan tumbuhan memiliki kedua jalur biosintesis isoprene tersebut pada setiap individunya perbedaannya hanyalah pada organ sel yang di tempat berlangsungnya proses reaksi tersebut (Lange *et al.*, 2000; Eisenrich *et al.*, 2001 dalam Agusta, 2006).

2.6.3.1 Biosintesa asam mevalonat

Biosintesis via mevalonat secara garis besar dibagi menjadi 4 tahapan. Pertama meliputi biosintesa prekursor dasar untuk pembentukan isopentenil pirospat (IPP), kedua adalah penambahan IPP secara repetitif membentuk prekursor perantara untuk berbagai macam kelas terpenoid. Ketiga adalah elaborasi alilik prenil dipospat oleh enzim terpenoid sintatase yang spesifik untuk menghasilkan kerangka karbon dari terpenoid itu sendiri, dan yang terakhir memodifikasi kerangka karbon secara enzimatik untuk menghasilkan diversitas struktur dan aktivitas biologis sebagai senyawa bahan alam. Berikut adalah skema (Gambar 2.6.4) jalur asam mevalonat:



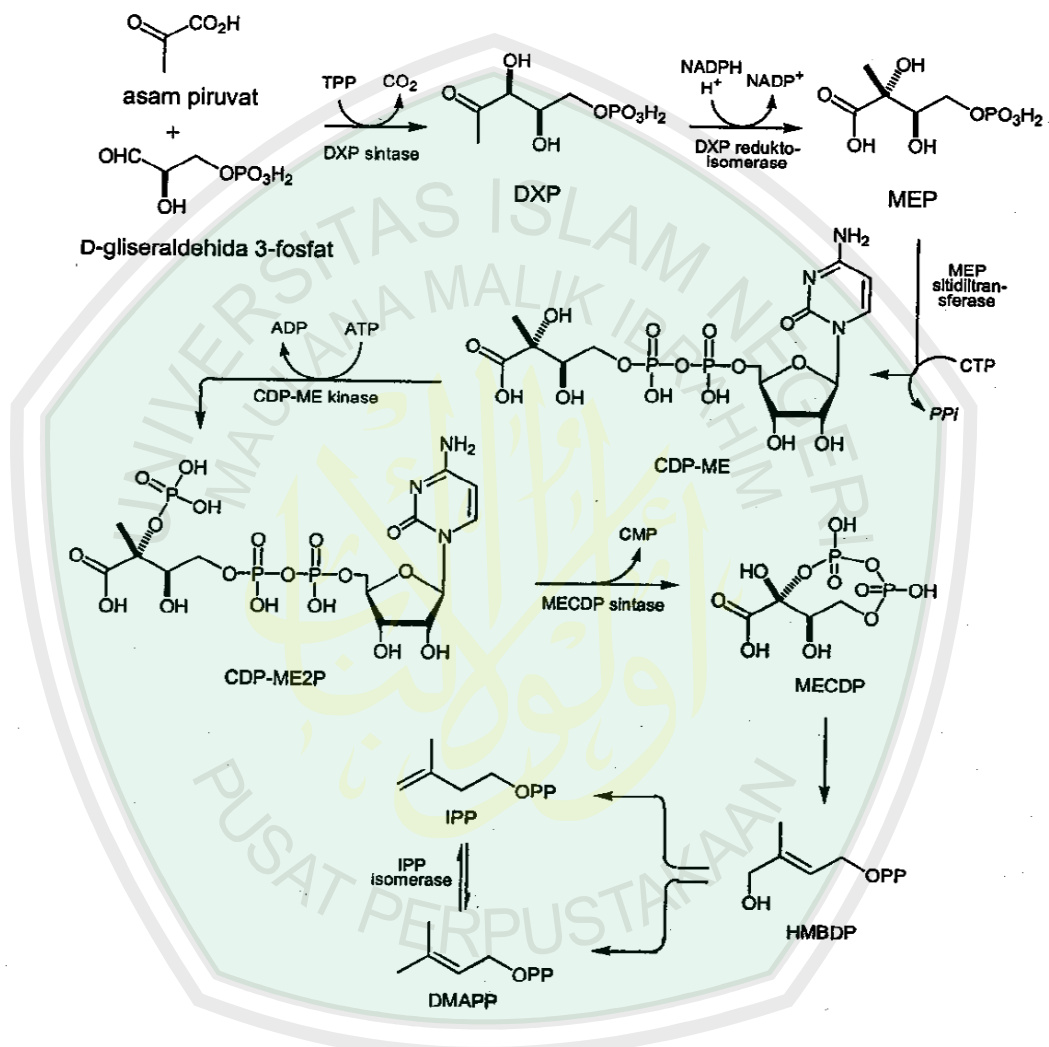
Gambar 2.6.4. Skema jalur Asam mevalonat (Agusta, 2006)

2.6.3.2 Biosintesa deoksiselulosa difosfat (DXP)

Pada tumbuhan biosintesa isoprena via DXP (biosintesa deoksiselulosa difosfat) tidak terjadi pada sitosol melainkan pada plastida dan hanya menghasilkan monoterpenoid dan triterpena (Kazuyama, 2003 dan Croteau, 2000). Pada jalur ini terdapat 6 tahap secara garis besar. Berikut merupakan tahapan skematik jalur DXP dan 6 tahap biosintesa melalui jalur deoksiselulosa difosfat (Agusta, 2006):

1. DX (Dioksiselulosa) akan diubah menjadi DPX dengan bantuan enzim D-Silulokinase yang disandi oleh gen *xylB*. Selanjutnya akan terjadi pembentukan 1-deoksi-D-silulosa5-fosfat (DXP) dari kondensasi asam piruvat dan tiaminapirpospat (TPP) serta D-glyseraldehida 3-fosfat yang dikatalisis oleh enzim DXP sintatase. DXP sintetase disandi oleh gen *dxs* (Rohmer, 1996; Lung *et al.*, 1998; Lois *et al.* 1998).
2. Terjadi reduksi DXP menjadi 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfat (MEP) dengan zat antara 2-C-metileritrosa-4-fosfat (MEOP) yang dikatalis oleh enzim DXP reduktoisomerase dengan sandi genetik gen *dxr*.
3. Kemudian terjadi reaksi antara MEP dan sitidiltrifosfat (CTP) menjadi zat antara 4-(sitidina 5'-difosfat)-2-C-metil-D-eritritol (CDP-ME) dengan bantuan katalisator enzim MEP sitidiltransferase, enzim ini memiliki sandi genetik gen *ygbp*.
4. Pada reaksi ini yang berperan penting adalah gen *ychb* yang menjadi penyandi enzim CDP-ME kinase. Enzim ini akan mengkatalisis reaksi konversi CDP-ME menjadi 2-fosfat-4-(sitidina 5'-difosfat)-2-C-metil-D-eritritol (CDP-ME2P) dengan ketersediaan ATP.
5. Kemudian terjadi konversi CDP-ME2P menjadi 2-C-metil-D-eritritol 2,4-siklodifosfat (MECDP) dengan katalisasi enzim MECDP sintetase yang memiliki sandi genetik gen *ygbB*.
6. Pada tahap terakhir terjadi konversi MECDP menjadi IPP atau DMAPP. Pada tahap ini MECDP akan diubah menjadi zat antara 1-hidroksi-2-metil-2-(E)-butenil 2-difosfat. Akan tetapi yang bertanggung jawab dalam tahap ini belum

jelas di ketahui jenisnya. Berikut adalah (Gambar 2.6.5) skema biosintesis melalui jalur DXP



Gambar 2.6.5 Skema Jalur DXP
(Agusta, 2006)

2.7 Elisitasi dan Peranan Ion Logam Cu^{2+} Sebagai elisitor Abiotik

Elisitasi merupakan proses penambahan elisitor pada sel tumbuhan dengan tujuan untuk menginduksi dan meningkatkan pembentukan metabolit sekunder. Selain itu, elisitasi merupakan suatu respon dari suatu sel untuk menghasilkan metabolit sekunder. Fitoaleksin itu sendiri merupakan senyawa antibiotik yang mempunyai berat molekul rendah, dan dibentuk pada tumbuhan tinggi sebagai respons terhadap infeksi mikroba patogen. Senyawa yang merupakan bagian dari mekanisme tersebut dapat dianalogikan dengan antibodi yang terbentuk sebagai respon imun pada hewan (Yoshikawa&Sugimito, 1993 dalam Ariningsih,2003). Elisitor selain dapat menginduksi sintesis fitoaleksin, ternyata dapat juga menginduksi sintesis metabolit sekunder yang bukan fitoaleksin pada kultur kalus dan sel (Eilert et al 1986 dalam Kusuma, 2011).

Elisitor terdiri atas dua kelompok, yaitu elisitor abiotik bisa berasal dari senyawa anorganik , radiasi secara fisik, seperti ultraviolet, logam berat, dan detergen. Kedua adalah elisitor biotik yang dikelompokkan dalam elisitor endogen, dan elisitor eksogen yaitu:

- a. Elisitor endogen, umumnya berasal dari bagian tumbuhan itu sendiri, seperti bagian dari dinding sel (poligogalakturonat) yang rusak. Rusaknya dinding sel ini, disebabkan oleh suatu serangan pathogen. Dinding sel yang rusak dan terluka oleh karena aktivitas enzim hidrolisis dari serangan pathogen.

b. Elisator eksogen, bisa berasal dari dinding jamur misalnya kitin, atau glukukan. Selain itu dapat berupa senyawa yang disintesis, misalnya protein (enzim) dan dapat juga berupa logam seperti Cu^{2+} , Mn, Al^{3+} (Salisbury & Ross, 1995).

Elisitasi dipengaruhi oleh spesifikasi elisitor, konsentrasi elisitor yang ditambahkan dan kondisi kultur (Vanconseulo & Boland 2007, Rhijwani & Shanks 1998). Konsentrasi elisitor yang ditambahkan ke dalam kultur suspensi sel sangat berpengaruh terhadap pertumbuhan kultur sel dan sintesis metabolit sekunder dalam kultur suspensi sel tersebut (Flocco *et al.* 1998). Jumlah elisitor yang ditambahkan ke dalam kultur sel biasanya sangat kecil dan ditambahkan pada tahapan pertumbuhan kultur tertentu (Collin & Edward 1998 dalam Habibah 2009).

Mekanisme elisitasi dalam menginduksi senyawa fitoaleksin pada jaringan tumbuhan dapat diduga dengan cara menstimulasi mRNA melalui suatu peningkatan dalam transkripsi gen-gen yang terlibat dalam pembentukan fitoaleksin dan senyawa metabolit lainnya. Menurut Angel (2006) pengikatan elisitor dalam kultur jaringan suatu tumbuhan dilakukan oleh membran plasma.

Oku (1994) dalam jurnal perpustakaan indonesia (2011) menyatakan terdapat dua hipotesis mengenai pengenalan elistor oleh sel-sel inang, yaitu:

1. Elisitor secara langsung berikatan dengan DNA yang terdapat pada inti sel tumbuhan sehingga dapat mengaktifkan transkripsi gen-gen untuk biosintesa fitoaleksin dan senyawa metabolit lainnya.

2. Pada membran sel tumbuhan terdapat reseptor untuk elisitor. Sama halnya dengan hipotesis pertama yaitu transduksi sinyal pada sel tumbuhan melalui Ca^{2+} yang bertindak sebagai *second messenger*. Resptor yang terdapat pada membran sel berfungsi sebagai sistem sensor sinyal eksternal yang kemudian di hantarkan ke dalam sistem *messenger intercelluler* melalui aktivasi adenilat siklase atau aktivasi fosfolipase. Proses ini akan memecuh respon seluler pada sel terhadap rangsangan eksternal untuk kemudian sel mengubah ekspresi gennya. Selain itu menurut Dmitrev (1996) dan Silalahi (1999) Menjelaskan bahwa akan terjadi peningkatan reaksi enzim-enzim dalam proses elisitasi yang diduga karena pengikatan elisitor pada reseptor membran plasma menyebabkan peningkatan Ca^{2+} interseluler yang bertindak sebagai *second messenger* untuk menginduksi transkripsi dan translasi enzim-enzim yang terlibat dalam jalur metabolit sekunder.

Secara garis besar proses elisitasi logam dapat diduga mempengaruhi dua jalur antara lain adalah:

1. Stress oksidatif (cekaman)

Ion logam Cu^{2+} berperan dalam pengaturan respon pertahanan diri pada tanaman dengan cara menginduksi gen dan meningkatkan jalur pembentukan metabolit sekunder. Fungsi elisitor abiotik ini sebagai signal transduksi pada sistem pertahanan diri tanaman terhadap stress akibat adanya cekaman lingkungan untuk memproduksi metabolit sekunder (Muryanti, 2005). Menurut Larcher dalam Salisbury dan Ross (1995b), tumbuhan yang mulai mendapatkan cekaman dari luar akan mengalami

tanda bahaya yang ditandai dengan terganggunya fungsi fisiologis dari proses fisiologis yang biasanya. Selanjutnya akan berlangsung tahap resistensi yaitu berlangsungnya proses adaptasi tanaman pada faktor cekaman lingkungan kemudian jika faktor cekaman meningkat dan terus berlangsung maka tanaman akan mengalami kematian.

Secara garis besar jika dilihat dari cekaman abiotik yang terjadi maka elisitasi ion logam Cu^{2+} akan mengaktifkan signal sistem pertahanan diri tumbuhan yang selanjutnya berfungsi sebagai penginduksi gen-gen yang berperan dalam produksi senyawa jenis terpenoid dan steroid melalui jalur biosintesa deoksiselulosa difosfat dan jalur asam mevalonat (Gambar 2.6.4 dan 2.6.5). Gen-gen yang terlibat dalam proses ini ada berbagai macam diantaranya ialah sebagai gen pengkode enzim D-Silulokinase yang disandi gen *xykB*, kemudian enzim DXP reduktoisomerase yang disandi oleh gen *dxr*, dan lain sebagainya seperti yang dapat dilihat dari skema pembentukan senyawa terpenoid dan steroid pada gambar 2.4.1 dan 2.6.3.

2. Kofaktor enzimatis

Ion logam Cu^{2+} merupakan mikronutrien esensial bagi seluruh makhluk hidup serta kofaktor dari banyak enzim serta memiliki peranan penting dalam transport electron, reaksi redoks dan berkaitan dalam berbagai jalur metabolisme. Reaksi redoks dan homeostasis ion logam memiliki kaitan dan menyebabkan stress oksidatif. Sehingga pada penelitian Ali *et al* (2006) menyatakan bahwa pemberian ion logam Cu

dapat meningkatkan metabolit sekunder dalam kultur jaringan. Ion logam Cu^{2+} di perlukan karena berperan dalam proses enzimatik seperti *cytochrom oxidase*, *ascorbic acid oxidase*, dan reaksi reduksi-oksidasi.

Peranan Cu^{2+} pada metabolisme steroid dapat memacu proses enzimatik yang berlangsung melalui lintasan asam mevalonat seperti pada gambar 2.8. Awalnya ion logam ini akan dapat menembus membrane sel, kemudian elisitor ini masuk dalam reaksi metabolisme tumbuhan dan membentuk metabolit primer dan sekunder. Di dalam proses pembentukan metabolit sekunder Cu^{2+} akan menstimulasi mRNA melalui suatu peningkatan dalam transkripsi gen-gen yang terlibat dalam pembentukan fitoaleksin dan senyawa metabolit lainnya. Selain itu menurut Hudoyono (2004) elisitor Cu^{2+} juga berperan sebagai kofaktor yang akan menempel pada sisi non protein pada enzim pemacu metabolisme metabolit sekunder jenis terpenoid dan steroid dari jalur isoprene. Enzim yang dapat memacu pembentukan senyawa steroid dan terpenoid antara lain adalah enzim IPP isomerase, GPP sintetase, FPP sintetase, skualena sintetase, dan skualena epoksidase yang dapat berlalui jalur asam mevalonat (gambar 2.6.4).

2.8 Hasil Penelitian Penggunaan Ion Logam Cu^{2+} Sebagai Elisitor Pembentukan Metabolit Sekunder

Penggunaan ion logam Cu^{2+} sebagai elisitor dalam pemetukan senyawa metabolit sekunder telah di lakukan oleh bebrapa peneliti, diantaranya oleh Sutini (2008) yang melaporkan bahwa dalam meningkatkan produksi senyawa flavan-3-ol pada kalus *Camellia sinensis* dilakukan dengan

menambahkan ion logam Cu^{2+} pada media dengan menggunakan konsentrasi 1, 5, dan 10 ppm dapat diketahui bahwa pada penambahan 5 ppm ion logam Cu^{2+} dapat meningkatkan senyawa flavan-3-ol sekitar 12,5%. Selain itu Oktafiana (2010) juga menambahkan ion logam Cu^{2+} dengan konsentrasi $5\mu\text{M}$, $10\mu\text{M}$, $15\mu\text{M}$, $20\mu\text{M}$, $25\mu\text{M}$, $30\mu\text{M}$, dan kontrol untuk meningkatkan senyawa campuran triterpenoid, dan hasilnya pada konsentrasi $15\mu\text{M}$ sampai $30\mu\text{M}$ dapat meningkatkan sebanyak dua kali lipat senyawa triterpenoid.

Rahayu (2009) juga melaporkan untuk meningkatkan kandungan isoflavon pada kedelai maka ditambahkan logam Cu^{2+} dengan konsentrasi 0,0125 ppm, 0,0250 ppm, dan 0,0375 ppm dan hasilnya kandungan isoflavon tertinggi didapatkan pada penambahan 0,0125ppm. Selain dengan menggunakan ion logam Cu^{2+} dapat juga digunakan elisitor dari jenis logam yang lain seperti Mg^{2+} , Al dan dapat juga menggunakan metil jasmonat.

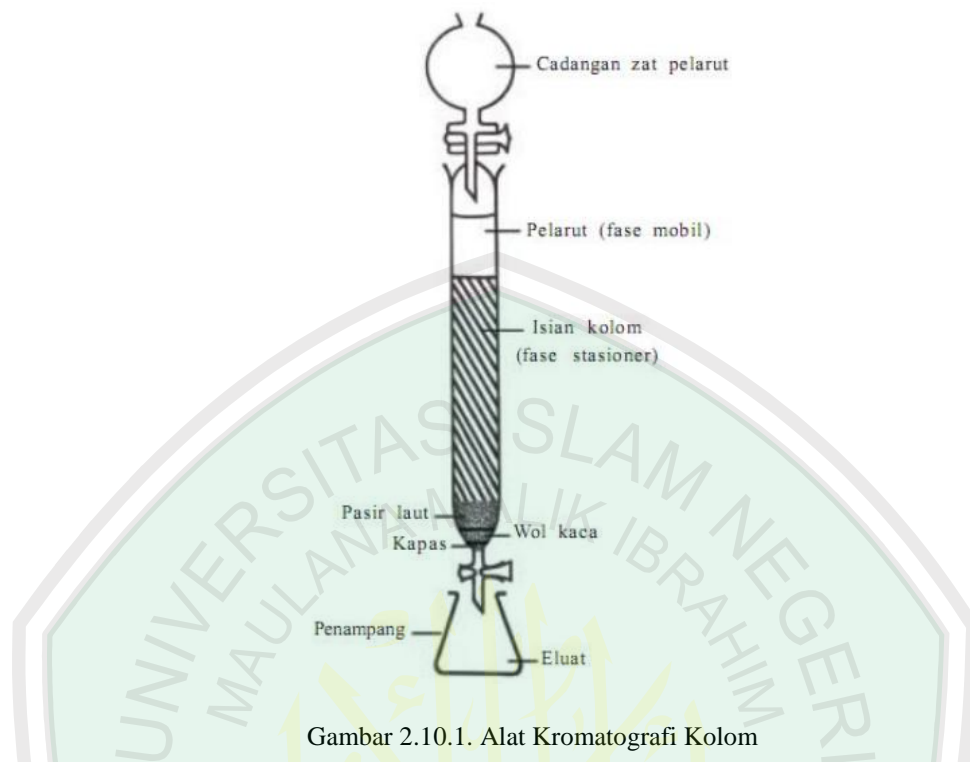
2.9 Metode Kromatografi Kolom

Kromatografi kolom merupakan alat yang digunakan untuk fraksinasi dan juga pemurnian suatu senyawa. Prinsip dari kromatografi kolom adalah pemisahan zat berdasarkan mekanisme adsorpsi, pembagian ion, pertukaran ion, afinitas dan perbedaan ukuran molekul. Sebagian adsorpsi, dapat di pergunakan alumina, silika gel, karbon adsorben, Mg Silikat Mg karbonat, pati, selulosa dan sebagainya. Sebagai eluennya misalnya air, metanol, etanol, aseton, dan sebagainya. Secara adsorpsi partikel padat dalam cairan akan cenderung mengabsorpsi atom, ion atau molekul pada permukaannya. Ikatan

mungkin bersifat ionik, dipol-dipol, dan lain-lain. Mekanisme partisi adalah pemisahan zat berdasarkan kelarutannya di antara dua zat cair tak tercampurkan, salah satunya merupakan fase diam yang di tahan oleh zat penunjang padat (Gandjar, 1991 dalam Putra,2010).

Kromatografi kolom merupakan metode kromatografi dengan fase gerak cair dan fase diam padat. Penggunaan fase gerak (eluen) disesuaikan dengan kepolaran senyawa yang akan dipisahkan. Fase diam ditempatkan dalam tabung kaca berbentuk silinder, pada bagian bawah tertutup dengan katup atau kran dan fase gerak dibiarkan mengalir ke bawah melaluinya karena gaya berat. Pada kondisi yang dipilih dengan baik, eluen yang merupakan komponen campuran, turun berupa pita dengan laju yang berlainan dan dengan demikian dipisahkan. Eluen biasanya dipisahkan dengan cara membiarkannya mengalir keluar dari kolom dan mengumpulkannya sebagai fraksi, seringkali dengan memakai pengumpul fraksi mekanis (Gritter *et al*, 1991 dalam Putra,2010).

Kromatografi kolom yang digunakan dalam fraksinasi ini adalah kromatografi kolom cair vakum (KCV). Metode ini merupakan modifikasi dari kromatografi kolom gravitasi dengan menambahkan vakum (penarik udara) pada bawah kolom. Dapat digunakan untuk fraksinasi atau memurnikan fraksi (Muhtadi, 2008). Digunakan metode ini karena KCV lebih efektif dan efisien dalam pemisahan dibandingkan dengan kromatografi kolom gravitasi (Novianti,2010).



Gambar 2.10.1. Alat Kromatografi Kolom

Tujuan kromatografi kolom adalah memisahkan komponen cuplikan, menjadi pita atau puncak, ketika cuplikan itu bergerak melalui kolom. Dalam praktek, dengan melihat bentuk puncak biasanya dapat ditaksir daya pisah sampai derajat yang memungkinkan kita memilih dengan cepat panjang kolom yang diperlukan untuk pemisahan. Keefisienan kolom merupakan fungsi dari parameter kolom, seperti laju aliran pelarut, ukuran partikel kemasan kolom, cara mengemas kolom, dan viskositas pelarut (Novianti,2010).