

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pengaruh Pemberian Ion Logam Cu^{2+} Terhadap Perkembangan Morfologi Kalus (Warna, Tekstur, dan Berat Kalus) Secara In Vitro

Purwoceng merupakan salah satu tumbuhan yang memiliki manfaat yang penting bagi kehidupan manusia satu diantaranya adalah akarnya yang dilaporkan berkhasiat obat sebagai afrodisiak (meningkatkan gairah seksual dan menimbulkan ereksi), diuretik (melancarkan saluran air seni), dan tonik (mampu meningkatkan stamina tubuh). Seperti yang dijelaskan Allah SWT pada surat Asy-Syu'ara ayat 7 yang menunjukkan tentang kekuasaan Allah yang telah menumbuhkan berbagai macam tumbuhan yang baik di muka bumi yang dapat di manfaatkan manusia untuk kebutuhan kehidupan. Sebagaimana yang telah difirmankan dalam surat Asy-syu'ara/26 ayat 7:

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ 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)

Purwoceng dapat ditumbuhkan melalui teknik kultur jaringan untuk mendapatkan kandungan kimia yang lebih tinggi. Indikator yang digunakan dalam teknik *in vitro* antara lain adalah morfologi kalus yang terdiri dari warna, tekstur dan berat kalus.

4.1.1 Warna Kalus

Warna kalus merupakan salah satu indikator dalam teknik kultur jaringan karena pada setiap eksplan akan menghasilkan warna kalus yang berbeda-beda dan dapat dipengaruhi oleh laju pertumbuhan kalus pada media tanam. Pada setiap konsentrasi pemberian ion logam Cu^{2+} kalus mengalami perubahan warna yang berbeda-beda. Perubahan yang terjadi pada warna kalus menunjukkan perubahan sesuai dengan laju pertumbuhannya, adapun data perubahan warna kalus disajikan pada tabel 4.1.

4.1 Data pengaruh pemberian ion logam Cu^{2+} terhadap perubahan warna kalus yang disajikan pada awal subkultur hingga akhir minggu ke 4:

Eksplan	Konsentrasi Cu^{2+}	Warna Kalus	
		Awal	Akhir
Daun	0 μM (E0)	H	Hk
	20 μM (E20)	Hb	c+
	30 μM (E30)	Hb	Cb
	40 μM (E40)	H	c++

Keterangan: h = kehijauan, hb = hijau bening, hk = hijau kecoklatan, c=coklat, dan cb =coklat bening (+: kepekatan warna sedang, ++:Kepekatan warna tinggi)

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

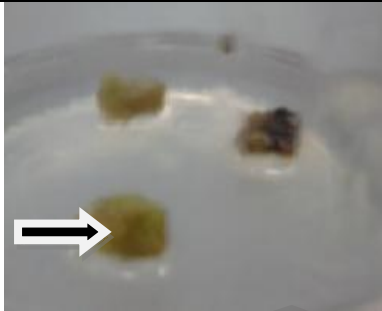
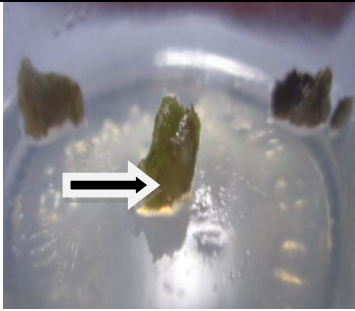


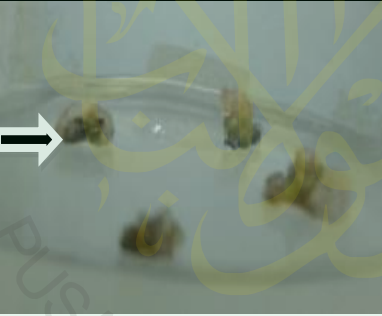
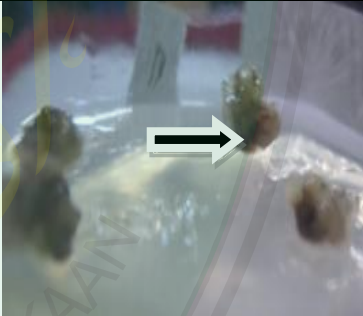
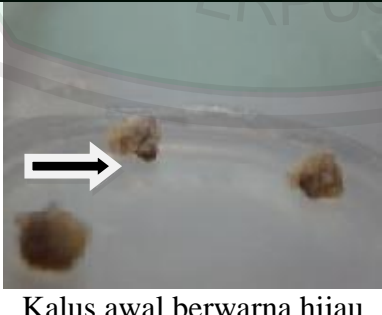

kondisi eksplan yang secara internal mempunyai kandungan fenol tinggi. Fenol akan teroksidasi menjadi kuinon fenolik oleh pengaruh cahaya.

Warna kalus yang didapatkan dari inisiasi kalus pada umumnya berwarna hijau karena kalus masih aktif mengalami pembelahan dan mengandung banyak klorofil. Hal ini sesuai dengan pernyataan Fatmawati (2008), warna kalus mengindikasikan keberadaan klorofil dalam jaringan, semakin hijau warna kalus semakin banyak pula kandungan klorofilnya. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa pada setiap minggunya warna kalus selalu menunjukkan perubahan, pada awal minggu kedua kebanyakan kalus berubah warna menjadi lebih pekat dan pada umumnya kalus berubah menjadi agak kecoklatan perubahan tersebut terjadi hingga minggu keempat atau pada hari ke 29 pengamatan.

Pada akhir minggu keempat setelah subkultur terjadi perubahan pada seluruh kalus yang ditanam pada media Cu^{2+} baik pada konsentrasi 20,30, dan 40 μM pada umumnya berubah berwarna kecoklatan. Perubahan ini diduga karena adanya substitusi antara ion Cu^{2+} pada media terhadap kalus sehingga semakin banyak ion Cu^{2+} menyebabkan perubahan warna kalus berubah semakin kecoklatan.

Pada konsentrasi 30 dan 40 μM pada awal subkultur kalus berwarna hijau setelah minggu kedua mengalami perubahan warna menjadi lebih hijau pekat kemudian pada minggu ketiga kalus berubah kecoklatan dengan permukaan sedikit berwarna bening dan pada minggu ke empat kalus

berubah warna menjadi coklat sedikit lebih pekat dengan permukaan yang bening (gambar 4.1), hal ini dikarenakan terjadinya regenerasi pada kalus sehingga menjadikan volume kalus menjadi bertambah. Sedikit berbeda dengan kalus pada konsentrasi 20 μM pada awal subkultur kalus memiliki warna hijau bening yang menandakan kalus masih aktif melakukan pembelahan. Setelah minggu kedua kalus berubah berwarna sedikit coklat hingga minggu keempat kalus berubah warna menjadi coklat lebih pekat. Pada pemberian ion logam Cu^{2+} warna kalus berubah menjadi lebih pekat dari yang lain akan tetapi kalus dalam kondisi mengalami pertumbuhan yang ditandai dengan adanya pembesaran sel sehingga ukurannya menjadi lebih besar. Perubahan warna kalus disajikan pada gambar 4.1.

Konsentrasi	Awal	Akhir
Kontrol	 <p>Kalus awal berwarna hijau</p>	 <p>Kalus akhir berwarna hijau kekuningan</p>
Cu 20 μ M	 <p>Kalus awal berwarna hijau bening</p>	 <p>Kalus akhir berwarna coklat sedang</p>
Cu 30 μ M	 <p>Kalus awal berwarna hijau bening</p>	 <p>Kalus akhir berwarna coklat bening</p>
Cu 40 μ M	 <p>Kalus awal berwarna hijau</p>	 <p>Kalus akhir berwarna coklat tua</p>

Gambar 4.1. Perubahan Warna Kalus pada media pemberian ion logam Cu^{2+} Pada usia 4 minggu setelah subkultur

Warna coklat yang terjadi pada kalus menunjukkan terjadinya sintesis senyawa fenolik. Vickery (2003) dalam Astutik (2007) menyatakan bahwa sintesis senyawa fenolik dipicu oleh cekaman atau gangguan pada sel tanaman. Cekaman atau gangguan yang terjadi pada sel tanaman disebabkan karena berkurangnya nutrisi yang ada dalam media. Menurut Dubravina (2005) dalam Astutik (2007), pencoklatan pada jaringan terkait dengan akumulasi fenol yang berlebihan. Fenol yang teroksidasi akan membentuk kuinon dan kuinon adalah senyawa yang menyebabkan adanya warna coklat pada kultur kalus. Intensitas warna coklat berkorelasi positif dengan hiperaktivitas enzim oksidatif (Naz, 2008), sedangkan peningkatan aktivitas enzim tersebut terkait dengan reaksi pertahanan jaringan dari stres oksidatif. Sehingga diasumsikan pencoklatan yang terjadi pada kalus ini diakibatkan stress yang dialami oleh kalus yang dikarenakan adanya cekaman ion logam Cu^{2+} . Hal ini diperkuat oleh Ariningsih (2003) menyatakan bahwa kondisi seperti ini disebabkan akumulasi fenol yang cukup besar pada kalus sebagai akibat absorbs ion Cu^{2+} yang lebih dari cukup.

Pada media kontrol mulai minggu pertama disubkultur kalus berwarna hijau segar dengan permukaan berwarna bening yang menandakan kalus melakukan regenerasi atau dikatakan dalam keadaan aktif membelah. Hingga akhir minggu kedelapan setelah sub kultur kalus berubah warna menjadi hijau kekuningan seperti pada gambar 4.1. Hal ini diasumsikan karena tidak ada penambahan Cu^{2+} yang dapat memberikan cekaman pada media pertumbuhan kalus sehingga kalus tidak mengalami perubahan

menjadi warna yang lebih pekat, akan tetapi kalus yang berwarna hijau menandakan bahwa kalus telah mengalami fotosintesis sehingga pertumbuhan kalus sedikit terhambat.

Menurut Harjoko (1999) dalam Rahayu *et al* (2003) menyatakan bahwa dengan berlanjutnya pertumbuhan kalus maka akan diikuti dengan perubahan warna kalus. Kalus muda berwarna putih, kemudian warnanya akan berubah menjadi hijau dengan bertambahnya umur dan menandakan adanya klorofil dan telah terjadi proses fotosintesis. Perbedaan warna kalus ini disebabkan adanya perubahan pigmentasi

Perubahan warna pada kalus setelah disubkultur juga diinduksi oleh pelukaan yang terjadi pada saat pemotongan eksplan dimana Verpoorte (1993) dalam Robbiani (2010) menjelaskan bahwa kalus yang berwarna coklat merupakan respon oksidasi senyawa fenolik akibat pelukaan suatu jaringan eksplan. Sedangkan kalus putih merupakan akibat dari tidak terbentuknya kloroplas atau degradasi klorofil dimana hal ini dapat terjadi karena konsentrasi sitokinin lebih dulu digunakan untuk pertumbuhan eksplan menjadi kalus.

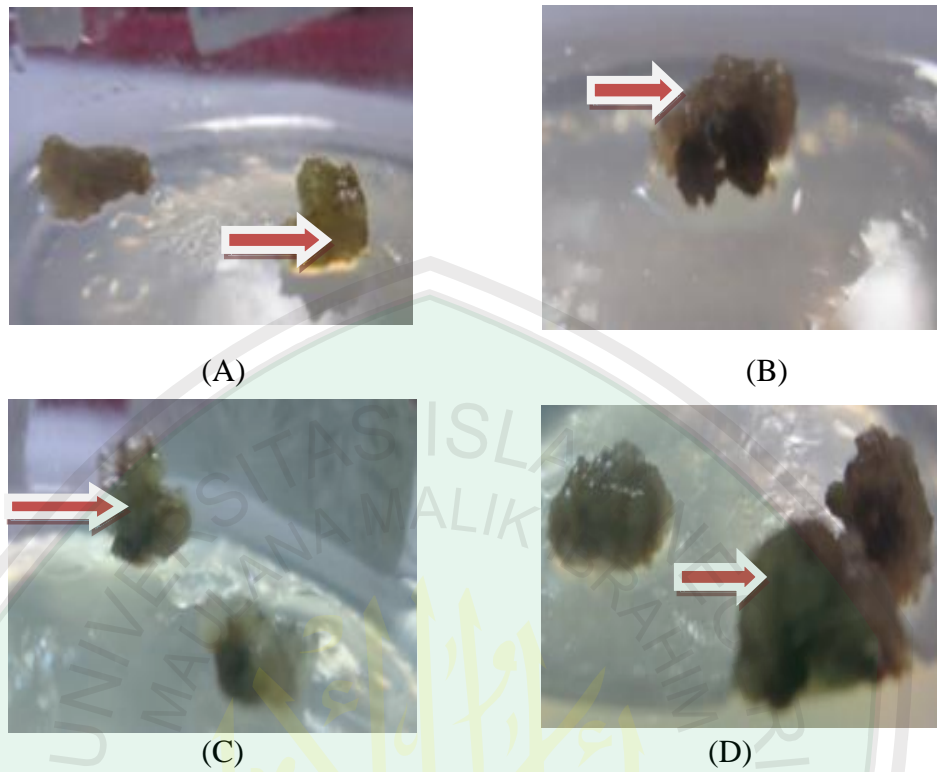
Menurut Ariningsih (2003) perubahan warna pada kalus juga tergantung pada media perkembangannya. Cekaman yang diberikan oleh media pada kalus mengindikasikan kalus akan berubah warna lebih tua dari kalus segar. Dengan demikian semakin tua perubahan warna kalus pada

suatu media menunjukkan adanya aktifitas biosintesis metabolit sekunder lebih tinggi dan lebih besar.

4.1.2 Tekstur Kalus

Tekstur kalus menjadi indikator kedua dalam pertumbuhan kalus. Tekstur kalus yang baik yaitu tekstur kalus yang remah (*friable*), karena tekstur yang remah lebih mudah untuk dipisah-pisahkan antara sel yang satu dengan sel yang lain. Selain remah kalus dapat pula membentuk tekstur yang kompak, hal ini terjadi melalui proses pertumbuhan yang mengarah pada pembentukan sel-sel yang berikatan rapat dan padat. Hormon 2,4-D dapat menstimulasi pemanjangan sel dengan cara penambahan plastisitas dinding sel menjadi longgar, sehingga air dapat masuk ke dalam dinding sel dengan cara osmosis dan sel mengalami pemanjangan. Oleh karena itu, kalus yang kompak mengandung banyak air karena belum mengalami lignifikasi dinding sel.

Pada umumnya kalus yang didapatkan dari inisiasi kalus memiliki tekstur yang kompak dan hingga akhir minggu pengamatan setelah dilakukan subkultur tidak terjadi perubahan baik pada konsentrasi 0, 20, 30, dan 40 μ M. Kalus yang kompak merupakan kalus yang mengalami perpanjangan sel yang membentuk susunan sel-sel yang rapat dan mengandung banyak air. Kalus kompak dapat ditunjukkan dengan gambar 4.2 Sebagai berikut:



Gambr 4.2. Perkembangan tekstur kalus pada media pemberian ion logam Cu^{2+} setelah berumur 4 minggu hari setelah subkultur. (A) kontrol, (B) Cu^{2+} 20 μM , (C) Cu^{2+} 30 μM , dan (D) Cu^{2+} 40 μM

Kalus yang kompak dapat disebabkan oleh beberapa hal diantaranya disebabkan karena sel-sel yang semula membelah mengalami penurunan aktivitas proliferasinya. Aktivitas ini dipengaruhi auksin alami yang terdapat pada eksplan asal (Santosa dan Nursandi, 2002). Menurut Street (1993) kalus yang kompak merupakan susunan sel-sel yang rapat dan sulit dipisahkan. Pierik (1987) juga menyatakan tekstur pada kalus dapat bervariasi dari kompak hingga meremah, tergantung pada jenis tanaman yang digunakan, komposisi nutrisi media, zat pengatur tumbuh dan kondisi lingkungan kultur.

Pada penelitian Ariningsih (2003) dijelaskan seluruh perlakuan penambahan ion logam Cu^{2+} terhadap perkembangan kalus pada *Morinda citrifolia* menunjukkan tekstur kalus yang ditunjukkan bertekstur kuat. Hal ini juga diperkuat oleh Street (1972) dalam Ariningsih (2003) bahwa tekstur kalus kompak merupakan susunan sel-sel kalus yang rapat, padat, sulit dipisahkan, memiliki proporsi vakuola yang lebih besar dan memiliki dinding sel polisakarida yang besar. Pada permukaan bawah eksplan terlihat kondisi jaringan yang berair. Kondisi ini disebabkan adanya bagian yang lengkung bersentuhan dengan media yang berperan sebagai area penyerapan nutrient bagi eksplan. Sehingga dapat diasumsikan tekstur kalus yang kompak terjadi karena menunjukkan adanya aktifitas metabolit sekunder yang tinggi sedangkan tekstur kalus remah menunjukkan tekstur kalus yang berpotensi sebagai pertumbuhan tunas dan embriogenesis.

Aisyah (2007) menyatakan bahwa kalus akan menghasilkan senyawa metabolit sekunder pada saat sel-sel kalus mengalami penurunan aktifitas pembelahan dan penurunan sel. Tekstur kalus yang kompak merupakan tekstur kalus yang mengalami pembelahan menuju fase stasioner sehingga kalus yang kompak cenderung mengalami pertumbuhan yang lambat jika di bandingkan dengan kalus remah yang memiliki sel-sel yang mudah dipisahkan dan cenderung memiliki daya untuk proliferasi atau melakukan pembelahan sel lebih cepat. Sehingga pada kalus kompak dapat dihasilkan produksi metabolit sekunder lebih tinggi dari pada kalus remah,

dan kalus remah merupakan kalus yang baik untuk upaya dilakukannya subkultur dalam perbanyak tanaman.

4.1.3 Berat Kalus

Pertambahan berat kalus ini dikarenakan terjadinya pembelahan pada kalus sehingga jumlah selnya menjadi bertambah. Perbedaan berat kalus yang terjadi dikarenakan oleh perbedaan kondisi yang dialami setiap kalus dalam pertumbuhannya.

Allah SWT menjelaskan dalam surat Al-Furqon ayat 2 yang menjelaskan bahwa Allah menciptakan segala sesuatu dimuka bumi ini sesuai dengan ukuran masing-masing. Maksud dari makna ayat tersebut menurut Ibnu Katsir adalah karena segala sesuatu selain Dia telah diciptakanNya dengan ukuran yang berbeda dan sesuai dengan ukurannya masing-masing yang menandakan bahwa dia memiliki fungsi dan peran yang berbeda serta memiliki sifat dan kondisi yang berbeda-beda pula. Berikut ini adalah firman Allah dalam surat Al-Furqon/25 ayat 2:

الَّذِي لَهُ مُلْكُ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ وَلَمْ يَتَّخِذْ وَلَدًا وَلَمْ يَكُن لَّهُ شَرِيكٌ
فِي الْمُلْكِ وَخَلَقَ كُلَّ شَيْءٍ فَقَدَرَهُ تَقْدِيرًا ﴿٢﴾

Artinya: “yang kepunyaan-Nya-lah kerajaan langit dan bumi, dan Dia tidak mempunyai anak, dan tidak ada sekutu bagiNya dalam kekuasaan(Nya), dan dia telah menciptakan segala sesuatu, dan Dia menetapkan ukuran-ukurannya dengan serapi-rapinya” (QS.Al-Furqon/25:02).

Pada penelitian ini penimbangan dilakukan pada awal subkultur dengan menyamakan berat kalus yang akan disubkultur pada masing-masing botol dengan konsentrasi Cu^{2+} 0, 20, 30, dan 40 μM dengan berat sekitar 0,1gr. Hasil penelitian menunjukkan adanya perubahan pada berat kalus pada masing-masing perlakuan. Penimbangan berat kalus dilakukan pada akhir minggu keempat setelah subkultur. Adapun penambahan berat kalus dapat diketahui pada tabel berikut ini (Tabel 4.2):

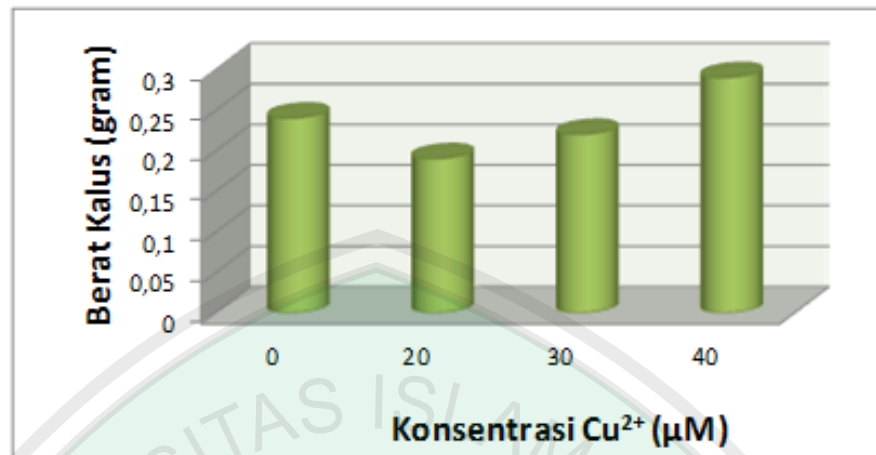
4.2 Data pengaruh pemberian ion logam Cu^{2+} terhadap berat kalus yang disajikan pada awal subkultur hingga akhir minggu ke 4:

Konsentrasi	Berat Kalus (gram)	
	Awal	Akhir
Cu^{2+} 0 μM (Kontrol)	0,1	0,24
Cu^{2+} 20 μM	0,1	0,19
Cu^{2+} 30 μM	0,1	0,22
Cu^{2+} 40 μM	0,1	0,29

Hasil diatas menunjukkan berat rata-rata dari masing-masing kalus. Pada media kontrol setelah penimbangan diketahui memiliki berat 0,24gr, kemudian pada media penambahan Cu^{2+} 20 μM berat kalus yang didapatkan adalah 0,19gr. Pada perlakuan yang lain dengan penambahan Cu^{2+} 30 μM ada media subkultur didapatkan berat kalus sebesar 0,22gr, dan pada

perlakuan terakhir dengan penambahan Cu^{2+} 40 μM didapatkan berat kalus sebesar 0,29gr.

Pada umumnya seluruh kalus mengalami kenaikan massa sel atau jumlah sel jika kita lihat dari data yang telah didapatkan. Perbedaan berat kalus yang terjadi diasumsikan karena beberapa faktor antara lain dikarenakan adanya cekaman pada media pertumbuhannya dan dapat juga disebabkan oleh morfologi kalus yang terbentuk. Dari data yang didapatkan diketahui berat kalus tertinggi terdapat pada perlakuan dengan penambahan Cu^{2+} sebesar 40 μM dengan berat kalus sebesar 0,29gr, sedangkan berat kalus terendah terdapat pada perlakuan penambahan Cu^{2+} sebesar 20 μM dengan berat kalus sebesar 0,19 gr. Perlakuan kontrol yaitu perlakuan tanpa penambahan Cu^{2+} memiliki berat kalus lebih besar dari berat kalus pada perlakuan Cu^{2+} 20 μM dan Cu^{2+} 30 μM yaitu sebesar 0,24gram. Hal ini dikarenakan pada perlakuan kontrol tidak terjadi cekaman sedangkan pada perlakuan Cu^{2+} 20, Cu^{2+} 30 dan Cu^{2+} 40 μM terjadi cekaman pada media pertumbuhannya sehingga dapat menyebabkan terhambatnya pertumbuhan kalus. Peningkatan berat kalus disajikan pada gambar 4.3.



Gambar 4.3. Diagram berat akhir kalus purwoceng (*Pimpinella alpine* Molk.) berumur 4 minggu setelah subkultur

Pertumbuhan kalus pada media perlakuan ini tergolong memiliki pertumbuhan yang agak lambat hal ini dikarenakan laju pertumbuhan pada media diduga adanya hambatan pada tahapan-tahapan siklus sel untuk membelah dan memperbanyak diri. Salah satunya adalah pada tahap G₁ yang kemungkinan berlangsung cukup lama karena pada tahap ini sel anakan yang terbentuk mulai tumbuh menjadi sel dewasa untuk berlanjut menuju tahap selanjutnya (Ariningsih, 2003). Selain itu menurut Reksoatmodjo (1993) lambatnya laju pertumbuhan ini juga dilihat pada tahap anafase yang terhambat karena adanya ion Cu²⁺ yang menyebabkan terganggunya kalus dalam penyerapan nutrisi sehingga kalus mengalami perlambatan dalam proses pembelahan.

Menurut Sutini (2008) menambahkan bahwa perlambatan pertumbuhan kalus pada media elisitasi dapat dikarenakan kalus

menyesuaikan diri pada media baru. Selain itu kondisi kalus masih berada dalam fase lag menuju fase linear pertumbuhan. Dan pada fase linear pembentukan metabolit sekunder mulai terjadi. Selain itu menurut Srivastava dan Gupta (1996) Ion-ion logam memiliki sifat antagonis didalam sel yaitu dengan adanya penghambatan penyerapan salah satu ion apabila ion yang satunya dalam kondisi berlebih. Jika ion Cu^{2+} berlebih diserap oleh sel maka mengakibatkan sel kekurangan Ca^{2+} yang terdapat didalam sel.

Hasil yang berbeda terjadi pada perlakuan Cu^{2+} 40 μM yang memiliki berat kalus tertinggi diantara perlakuan yang lain dengan berat kalus sebesar 0,29gr. Hal ini dikarenakan oleh pengaruh morfologi tekstur kalus yang terbentuk. Kalus kompak merupakan kalus yang kuat memiliki banyak kandungan air jadi semakin kompak tekstur kalus yang terbentuk dapat mempengaruhi berat kalus yang dihasilkan.

Menurut Rahayu *et al.* (2003) menyatakan bahwa berat segar kalus yang besar ini disebabkan karena kandungan airnya yang tinggi. Selain itu berat basah yang dihasilkan juga sangat tergantung pada kondisi morfologi kalus, kecepatan sel-sel tersebut membelah diri, memperbanyak diri dan dilanjutkan dengan membesarnya kalus. Ariningsih (2003) juga menyebutkan bahwa tekstur kalus kompak merupakan susunan sel-sel kalus yang rapat, padat, sulit dipisahkan, memiliki proporsi vakuola yang lebih besar dan memiliki dinding sel polisakarida yang besar. Pada permukaan bawah eksplan terlihat kondisi jaringan yang berair.

Selain itu terhambatnya laju pertumbuhan kalus dapat juga dikarenakan kondisi kalus pada saat tahap inisiasi, yang artinya jika pada tahap inisiasi kalus dalam keadaan tidak baik dengan warna yang agak kecoklatan atau berwarna hijau yang lebih pekat dan kurang menunjukkan adanya proliferasi sel, maka dapat diasumsikan pada saat dilakukan subkultur dengan media perlakuan menggunakan ion-ion logam akan mengalami perhambatan yang lebih besar dari pada kalus yang baik yang menunjukkan laju pertumbuhan dan pembelahan yang lebih baik. Hal ini dijelaskan oleh Ariningsih (2003) bahwa laju pertumbuhan kalus baik pada media inisiasi maupun media perlakuan dapat diduga dikarenakan adanya kondisi internal pada kalus baik secara anatomi maupun secara morfologi.

4.2 Pengaruh Pemberian Ion Logam Cu^{2+} Terhadap Kadar Senyawa Stigmasterol dan Sitosterol Kalus Purwoceng (*Pimpinella alpine* Molk.) Secara In vitro.

Metabolit sekunder adalah salah satu tujuan dalam teknik kultur jaringan, diharapkan dengan teknik kultur jaringan maka akan mendapatkan produksi metabolit sekunder lebih tinggi dari metabolit sekunder yang ada di alam. Dalam teknik kultur jaringan terdapat metode penambahan ion logam Cu^{2+} yang dikenal dengan elisitasi yang merupakan metode dalam meningkatkan pembentukan metabolit sekunder. Prinsip kerja elisitasi secara garis besar adalah dengan mengacu pada proses cekaman yang terjadi pada tumbuhan sehingga di alam tumbuhan akan melakukan pertahanan diri

dengan memproduksi metabolit sekunder lebih tinggi, maka prinsip kerja ini diterapkan dalam teknik kultur jaringan.

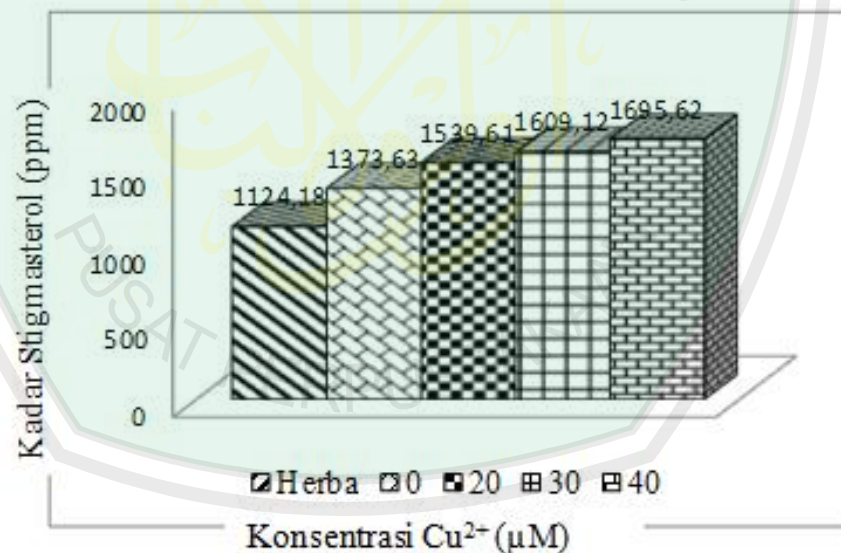
Pengujian hasil metabolit sekunder dilakukan dengan menggunakan kromatografi kolom. Metode kromatografi kolom ini menggunakan standart pengujian berupa bahan sintesis stigmasterol untuk pengujian stigmasterol dan β -sitosterol untuk pengujian sitosterol. Setelah dilakukan pengujian menggunakan kromatografi kolom maka didapatkan hasil metabolit sekunder berupa senyawa stigmasterol dan sitosterol dengan kadar sebagai berikut (tabel 4.3):

4.3 Data rata-rata pengaruh pemberian ion logam Cu^{2+} terhadap kadar stigmasterol dan sitosterol yang dihasilkan kalus purwoceng.

Konsentrasi	Kadar Metabolit sekunder	
	Stigmasterol (ppm)	Sitosterol (ppm)
Herba akar	1124.17	2002.67
Cu^{2+} 0 μM (kontrol)	1373.628	2443.800
Cu^{2+} 20 μM	1539.607	2545.830
Cu^{2+} 30 μM	1609.122	2856.512
Cu^{2+} 40 μM	1695.620	3128.739

Dari hasil pengujian produksi metabolit sekunder dengan menggunakan kromatografi kolom dapat diketahui bahwa kadar stigmasterol

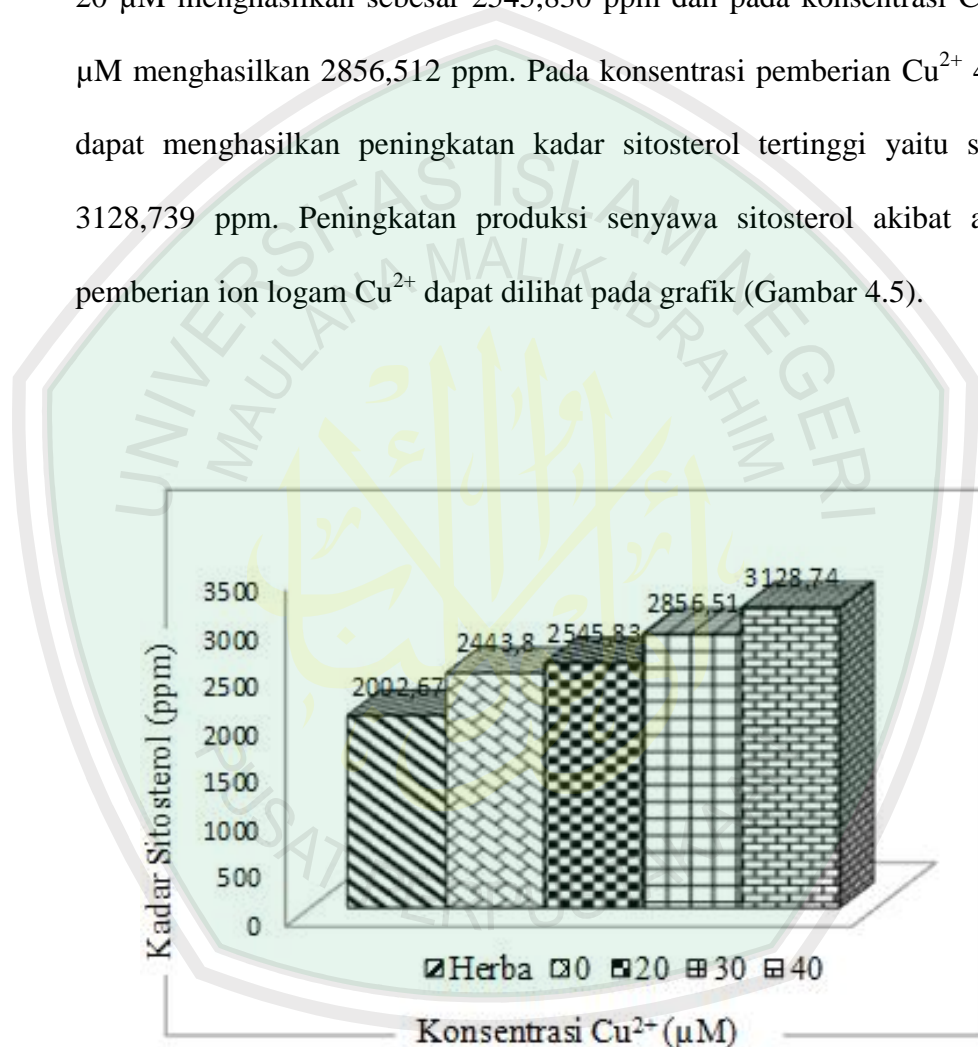
mengalami peningkatan, yaitu pada penambahan elisitor ion logam Cu^{2+} 0 μM menghasilkan kadar stigmasterol 1373,628 ppm, pada konsentrasi Cu^{2+} 20 μM menghasilkan 1539.607 ppm, konsentrasi Cu^{2+} 30 μM menghasilkan 1609,122 ppm dan pada konsentrasi Cu^{2+} 40 μM menghasilkan kadar stigmasterol tertinggi yaitu 1695,620 ppm. Pada kontrol dengan kondisi tanpa adanya elisitor Cu^{2+} menghasilkan stigmasterol sebesar 1373.628 ppm dan pada tanaman herba akar hanya terdapat 1124.17 ppm, sehingga dapat dikatakan bahwa elisitor abiotik ini mampu meningkatkan produksi metabolit sekunder pada kalus purwoceng (*Pimpinella alpine* Molk.) yang berupa senyawa stigmasterol (Gambar 4.4).



Gambar 4.4. Diagram pengaruh pemberian ion logam Cu^{2+} terhadap kadar stigmasterol pada kalus purwoceng (*Pimpinella alpine* Molk.) setelah berumur 4 minggu

Selain stigmasterol, elisitor Cu^{2+} juga meningkatkan senyawa lain yang terkandung pada kalus purwoceng yaitu senyawa sitosterol.

Peningkatan yang terjadi pada produksi senyawa sitosterol dapat dikatakan lebih tinggi dari senyawa stigmasterol yaitu pada konsentrasi Cu^{2+} 0 μM menghasilkan kadar sebesar 2443,800 ppm, kemudian pada konsentrasi Cu^{2+} 20 μM menghasilkan sebesar 2545,830 ppm dan pada konsentrasi Cu^{2+} 30 μM menghasilkan 2856,512 ppm. Pada konsentrasi pemberian Cu^{2+} 40 μM dapat menghasilkan peningkatan kadar sitosterol tertinggi yaitu sebesar 3128,739 ppm. Peningkatan produksi senyawa sitosterol akibat adanya pemberian ion logam Cu^{2+} dapat dilihat pada grafik (Gambar 4.5).



Gambar 4.5. Diagram pengaruh pemberian ion logam Cu^{2+} terhadap kadar sitosterol pada kalus purwoceng (*Pimpinella alpine* Molk.) setelah berumur 4 minggu

Dari diagram diatas dapat diketahui bahwa kandungan metabolit sekunder berupa stigmasterol dan sitosterol tertinggi dihasilkan pada

konsentrasi Cu^{2+} 40 μM dengan kadar stigmasterol 1695,620 ppm dan sitosterol 3128,739 ppm. Jika dibandingkan dengan kandungan metabolit sekunder pada tanaman herba akar dengan kadar stigmasterol 1124,17 ppm dan sitosterol 2002,67 ppm dapat diketahui bahwa kandungan metabolit sekunder pada tanaman herba purwoceng lebih rendah dari hasil metabolit sekunder pada kalus purwoceng pada perlakuan kontrol. Dan jika dibandingkan dengan kontrol yaitu tanpa pemberian ion logam Cu^{2+} dengan kadar stigmasterol 1373,628 ppm dan sitosterol 2443,800 maka dapat diketahui bahwa pemberian ion logam Cu^{2+} pada kalus menghasilkan metabolit sekunder yang lebih tinggi dari kontrol dan tanaman herba.

Menurut Kusuma (2011) bahwa terjadinya peningkatan produksi metabolit sekunder yang terkandung dalam kalus purwoceng (*Pimpinella alpiene* Molk.) dapat dipengaruhi oleh adanya ion logam Cu^{2+} sebagai elisitor karena dengan adanya interaksi patogen dan cekaman dengan inang sehingga dapat menginduksi produksi fitoaleksin dan senyawa metabolit lainnya. Menurut Sutini (2008) menambahkan bahwasannya elisitasi perlu akan adanya optimasi antara lain yaitu konsentrasi, waktu elisitasi dan dosis. Penambahan Cu^{2+} dalam kultur jaringan sampai dosis tertentu mampu mempengaruhi akumulasi metabolit sekunder, hal ini disebabkan karena ion logam Cu^{2+} dapat berfungsi sebagai pemacu terhadap aktivitas enzim, membrane sel dan Ca^{2+} sehingga berpengaruh pada metabolisme, hasil metabolisme dan pertumbuhan sel.

Secara umum pengaruh pemberian elisitasi sebagai induksi produksi fitoaleksin dan senyawa metabolit lainnya dapat diduga secara langsung berikatan dengan DNA yang terdapat pada intisel tumbuhan dengan cara elisitor masuk kedalam sel melalui reseptor yang terdapat pada membrane sel yang kemudian dihantarkan kedalam system *messenger intracellular* melalui aktivasi fosfolipase dalam sel kemudian elisitor dapat mengubah ekspresi gen yang dapat mengaktifkan transkripsi gen-gen untuk biosintesa metabolit sekunder. Asumsi yang kedua yaitu elisitor masuk kedalam membran sel yang kemudian menjadi signal dalam sel tumbuhan melalui Ca^{2+} yang bertindak sebagai *second messenger*. Proses ini akan memacu respon seluler pada sel terhadap rangsangan eksternal untuk kemudian sel mengubah ekspresi gennya (Oku, 1994).

Menurut Ali *et al* (2006) mekanisme peranan elisitor ion logam Cu^{2+} dapat melalui dua jalur yang pertama yaitu dapat mengakibatkan terjadinya stress oksidatif pada kalus dan yang kedua yaitu sebagai kofaktor enzimatis pada proses pembentukan senyawa stigmasterol dan sitosterol. Dalam kondisi stress Ion logam Cu^{2+} berperan dalam pengaturan respon pertahanan diri pada tanaman dengan cara menginduksi gen dan meningkatkan jalur pembentukan metabolit sekunder (Muryanti, 2005).

Menurut Larcher dalam Salisbury dan Ross (1995), 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 hingga mengalami kematian. Proses secara garis besar ion logam Cu^{2+} akan mengaktifkan signal yang berfungsi menginduksi gen-gen yang berperan dalam produksi senyawa jenis steroid dan terpenoid yang terjadi melalui dua jalur biosintesis yaitu jalur asam mevalonat dan jalur deoksiselulosa difosfat (DXP) (Gambar 2.8 dan 2.9).

Selain itu 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 berlalu pada jalur asam mevalonat (gambar 2.8).

Pengujian kalus setelah perlakuan dilakukan setelah berumur 4 minggu setelah subkultur dengan pertimbangan pada hari ke 30 atau ke 29 setelah sub kultur kalus mengalami fase pertumbuhan linear yang artinya

pembelahan sel mulai menurun dan terjadi penurunan kecepatan tumbuh. Hal ini dikarenakan fase linear merupakan fase yang dekat dengan fase stasioner. Pada fase stasioner adalah fase konstan yang menyebabkan produksi metabolit sekunder mengalami peningkatan.

Menurut Darwati (2007) 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 dalam Darwati, 2007). Metabolit sekunder pada umumnya meningkat pada fase stasioner. Hal ini diasumsikan 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.

Warna, tekstur dan berat kalus juga dapat mempengaruhi terjadinya peningkatan kadar stigmasterol dan sitosterol pada kalus purwoceng. Jika dihubungkan dengan penambahan ion logam Cu^{2+} maka perubahan warna kalus menandakan adanya peningkatan metabolit sekunder karena perubahan warna kalus yang semakin pekat menandakan adanya aktifitas produksi metabolit sekunder yang semakin tinggi.

Begitu pula dengan tekstur kalus, tekstur yang kompak dapat menghasilkan produksi metabolit sekunder lebih tinggi, hal ini dikarenakan pada kalus kompak menunjukkan penurunan aktifitas pembelahan sel dan pertumbuhan sel. Selain itu tekstur kalus juga mempengaruhi berat basah kalus, sehingga tekstur kalus kompak menyebabkan berat basah kalus yang tinggi dan dapat menghasilkan metabolit sekunder yang tinggi, seperti yang dijelaskan oleh Aisyah (2007) yang menyatakan bahwa kalus akan menghasilkan senyawa metabolit sekunder pada saat sel-sel kalus mengalami tanda-tanda penurunan aktifitas pembelahan dan penurunan sel.

