

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Deskripsi Tumbuhan Purwoceng (*Pimpinella alpina* Molk.)

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

Menurut Dasuki (1991), sistematika botani purwoceng sebagai berikut :

Kingdom Plantae
Divisi Spermatophyta
Kelas Dicotyledonae
Ordo Apiales
Famili Apiaceae
Genus *Pimpinella*
Spesies *Pimpinella alpina* Molk.

2.1.2 Habitat Tumbuhan Purwoceng (*Pimpinella alpina* Molk.)

Purwoceng (*Pimpinella alpina* Molk.) merupakan tumbuhan obat asli Indonesia. Tumbuhan ini hidup secara endemik di daerah pegunungan seperti Dataran Tinggi Dieng dan Gunung Lawu di Jawa Tengah, Gunung Pangrango dan Gunung Galunggung di Jawa Barat, serta di Pegunungan Tengger dan Iyang di Jawa Timur (Heyne, 1987). Purwoceng hidup disekitar 2.000-3.000 m dpl. Tumbuhan ini juga dapat ditemukan di Ranu Pani di Pegunungan Semeru dalam jumlah yang terbatas. Jumlah tumbuhan Purwoceng yang terbatas ini disebabkan karena penggunaan yang berlebihan sehingga menyebabkan semakin sedikit populasi dari Purwoceng.

Allah menciptakan tumbuhan di muka bumi untuk kesejahteraan makhluk hidup, tetepi Allah merang berlehi-lebihan dalam memanfaatkan

ciptaan-Nya. Seperti dalam Firman-Nya Surat Al An'aam/6 ayat 141 yang berbunyi:

﴿ وَهُوَ الَّذِي أَنْشَأَ جَنَّاتٍ مَّعْرُوشَاتٍ وَغَيْرَ مَعْرُوشَاتٍ وَالنَّخْلَ وَالزَّرْعَ مُخْتَلِفًا أُكْلُهُ وَالزَّيْتُونَ وَالرُّمَانَ مُتَشَابِهًا وَغَيْرَ مُتَشَابِهٍ ۚ كُلُوا مِنْ ثَمَرِهِ إِذَا أَثْمَرَ وَءَاتُوا حَقَّهُ يَوْمَ حَصَادِهِ ۗ وَلَا تُسْرِفُوا ۚ إِنَّهُ لَا يُحِبُّ الْمُسْرِفِينَ ۝﴾

Arinya: “dan Dialah yang menjadikan kebun-kebum yang berjunjung dan yang tidak berjunjung, pohon korma, tanam-tanaman yang bermacam-macam buahnya, zaitun dan delima yang serupa (bentuk dan warnanya) dan tidak sama (rasanya). makanlah dari buahnya (yang bermacam-macam itu) bila Dia berbuah, dan tunaikanlah haknya di hari memetik hasilnya (dengan disedekahkan kepada fakir miskin); dan janganlah kamu berlebih-lebihan. Sesungguhnya Allah tidak menyukai orang yang berlebih-lebihan” (QS. Al An'aam/6: 141).

Menurut Sayyid Qutub dalam Shihab (2002), sesungguhnya Allah menciptakan segala sesuatu berupa buah-buahan, binatang ternak dan kenikmatan lainnya, tiada lain hanya untuk mengingat tentang keagungan dan kemuran Allah Swt supaya bisa bersyukur dan bertaqwa atasnya. Bentuk kasih sayang Allah Swt dengan memberi semua kebutuhan makhluknya, keberaneka ragam inilah yang terkadang membuat segala sesuatunya akan menyebabkan kelalain. Thahir ibn Asyur menilai bahwa ayat ini mengingatkan nikmat-nikmat yang di anugerahkan Allah Swt kepada manusia melalui apa yang diciptakan-Nya di bumi untuk kemaslahatan mereka. Sesudah kecaman terhadap aneka tindakan kaum musyrikin atas nikmat-nikmat Allah serta kritik pedas akibat kepicikan mereka yang telah mengharamkan atas diri mereka sebagian dari nikmat itu, padahal Allah swt maha pengasih lagi maha penyayang.

Berdasarkan ayat di atas sesungguhnya segala sesuatu yang berlebihan akan mendatangkan kemudhorotan dan tidak baik, dan Allah Swt tidak menyukai orang yang berlebihan, seperti dalam penggunaan Purwoceng yang berlebihan menyebabkan tumbuhan ini mengalami kelangkaan.

Habitat asli tanaman purwoceng sudah punah dengan rusaknya hutan konservasi akibat kegiatan eksploitasi yang berlebihan sehingga konservasi *in situ* (pada habitatnya) tidak dapat diandalkan. Maka dilakukan konservasi *ex situ* (di luar habitatnya). Tetapi Tanaman purwoceng sulit dibudidayakan di luar habitat aslinya sehingga konservasi *ex situ* di lapang juga menghadapi permasalahan. Mariska *et al.* (1996), menyatakan bahwa konservasi di lapang menghadapi resiko hilangnya populasi tanaman tersebut karena cekaman biotik (organisme pengganggu tanaman) dan abiotik seperti kekeringan, banjir, atau kebakaran. Pemeliharaan tanaman di lapang juga akan membutuhkan area, tenaga, waktu, dan biaya yang besar.

Menurut Rahardjo (2003) dalam Darwati dan Roostika (2006), kepentingan tersebut juga disebabkan oleh rusaknya hutan konservasi yang menjadi habitat asli purwoceng. Selain itu, kepentingan juga disebabkan oleh langkanya budi daya purwoceng di tingkat petani karena adanya pencurian yang terkait dengan mahalnya komoditas tersebut.

Menurut *Convention on International Trading in Endangered Species* (CITES), tanaman tersebut dimasukkan dalam Apendiks I sehingga tanaman ini sangat dilindungi. Oleh sebab itu upaya untuk konservasi dan perbanyakan

jenis tanaman ini perlu dilakukan untuk pengembangan di masa mendatang (Roostika *et al.*, 2006).

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

Tanaman purwoceng adalah tanaman terna parenial, habitus tanaman membentuk roset, tangkai daun berada diatas permukaan tanah. Tangkai daun tumbuh rapat menutupi batang tanaman, seolah batang tanaman tidak ada, jumlah tangkai daun kurang lebih sekitar 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) (Raharjo dan Yuhono, 2006).



Gambar 2.1 Morfologi dari Purwoceng (*Pimpinella alpina* Molk.) a = tanaman, b = bunga kuncup, c = bunga mekar, d = buah, dan e = akar dari tanaman berumur 6 bulan. (Darwati, 2006).

Purwoceng memiliki daun majemuk berpasangan berhadapan. Bentuk anak daun membulat dengan tepi bergerigi. Warna permukaan atas daun hijau dan permukaan bawah hijau keputihan. Purwoceng memiliki akar tunggang yang membesar membentuk struktur seperti umbi pada tanaman ginseng tapi dengan ukuran yang lebih kecil (Rahardjo *et al.* 2006).

Purwoceng memiliki bunga majemuk yang membentuk payung. Setiap tanaman mempunyai sekitar 4-9 tangkai bunga primer. Setiap tangkai primer rata-rata memiliki 4-5 tangkai sekunder. Sementara setiap tangkai sekunder mempunyai rata-rata 4-10 tangkai tersier dan tangkai tersier mempunyai 8-10 tandan bunga. Setiap tandan bunga yang berbentuk payung tersebut terdapat 8-15 bunga yang akan membentuk biji.

Purwoceng merupakan tanaman berumah satu namun dapat menyerbuk silang. Tanaman mulai berbunga pada umur 7 bulan dan mencapai 100% berbunga pada umur 9 bulan. Biji yang telah masak berwarna hitam, berukuran sangat kecil sekitar 0.52 g per 1 000 butir biji (Rahardjo *et al.* 2006).

2.1.4 Kandungan Bahan Aktif dan Khasiat

Allah menjelaskan dalam firmanNya dalam surat Thaahaa/20 ayat 53 yang berbunyi:

الَّذِي جَعَلَ لَكُمُ الْأَرْضَ مَهْدًا وَسَلَكَ لَكُمْ فِيهَا سُبُلًا وَأَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَخْرَجْنَا بِهِ
أَنْوَاجًا 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.Thaaahaa/20: 53)

Allah menjelaskan pada QS.Thaaahaa/20: 53 bahwa Allah telah menciptakan berbagai macam tumbuhan dari air hujan. 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 tumbuh-tumbuhan agar terus berkembang. Oleh karena itu tumbuhan yang sudah ditumbuhkan oleh Allah seharusnya kita jaga agar dapat dimanfaatkan sebaik-baiknya. Tumbuhan merupakan salah satu bahan pokok yang digunakan manusia untuk berbagai macam kepentingan, misalnya untuk bahan pangan. Kesemuanya itu dimanfaatkan untuk kelangsungan hidup manusia agar manusia tetap hidup di bumi Allah.

Tumbuhan yang bermacam-macam ini memiliki manfaat yang dapat digunakan atau dimanfaatkan oleh makhluk hidup lain. Satu dari tumbuhan yang dapat bermanfaat bagi makhluk hidup yaitu Purwoceng (*Pimpinella alpina* Molk.). Tumbuhan ini memiliki berbagai khasiat yang sangat bermanfaat bagi manusia, dimana Purwoceng berkhasiat sebagai obat afrodisiak.

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). Menurut Sidik *et al.*, (1985) dalam Rostiana *et al.*, (2006) melaporkan bahwa akar purwoceng juga mengandung turunan senyawa kumarin yaitu senyawa bergapten, iso-bergapten dan saponin, yang banyak digunakan dalam industri obat moderen sebagai obat analgesik, anti piretik, sedatif, anthelmitik, anti fungi, anti bakteri dan anti kanker.

Akar purwoceng diketahui mengandung turunan senyawa kumarin, sterol, alkaloid, saponin (Caropeboka & Lubis 1975, Rostiana *et al.* 2003), flavonoid, glikosida dan tanin (Rostiana *et al.* 2003), kelompok furanokumarin seperti bergapten, isobargapten dan sphondin (Sidik *et al.* 1975). Sementara ternanya mengandung stigmasterol dan bergapten (Rahardjo *et al.* 2006, Rostiana *et al.* 2007), vitamin E (Rahardjo *et al.* 2006), saponin, alkaloid, glikosida, kumarin dan triterpenoid-steroid (Rostiana *et al.* 2003) dalam Ajijah, 2009).

Suzery *et al.* (2004), menunjukkan adanya senyawa stigmasterol dalam akar purwoceng berdasarkan data spektroskopidengan UV-Vis, FTIR dan GC-MS. Hernani dan Rostiana (2004) melaporkan pula adanya senyawa kimia yang teridentifikasi secara kualitatif, yaitu bergapten, marmesin, 4-hidroksi kumarin, umbeliferon, dan psoralen.

Akar Purwoceng memiliki banyak khasiat, salah satunya sebagai obat afrodisiak. Hal ini didukung dengan penelitian yang dilakukan oleh Taufiqurrachman (1999), yang melaporkan bahwa ekstrak akar purwoceng

sebanyak 50 mg mampu meningkatkan kadar hormon LH (*Luteinizing hormone*) dan testosteron dibandingkan dengan kontrol (tanpa pemberian ekstrak) pada tikus Sprague Dawley. Tetapi ketika purwoceng dicampurkan dengan pasak bumi pada dosis yang sama (masing-masing 25 mg), menunjukkan terjadinya peningkatan kadar testosteron lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan lainnya.

Menurut Juniarto (2004) dalam Darwanti (2006), bahwa ekstrak akar purwoceng yang diberikan pada tikus Sprague Dawley juga dapat meningkatkan derajat spermatogenesis dalam testis, jumlah maupun motilitas spermatozoa dibandingkan dengan kontrol (tanpa pemberian purwoceng) namun cenderung tidak berbeda dengan perlakuan pasak bumi.

2.2 Kultur Jaringan

Allah menjelaskan dalam firman-Nya dalam surat Asy-Syu'ara/26 ayat 7 yang berbunyi:

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 pelbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik?*”(QS. Asy-Syu'ara/26:7)

Munurut Shihab (2002), kata (إلى) pada firmanNya di atas, merupakan kata yang mengandung makna *batas akhir*. Ia berfungsi memperluas arah pandang hingga batas kemampuannya memandang sampai mencakup seantero bumi, dengan aneka tanah dan tumbuhannya, serta aneka keajaiban yang terhampar pada tumbuhan-tumbuhannya. Sedangkan kata (زوج),

diartikan *pasangan*, dalam hal ini yang dimaksud adalah pasangan tumbuh-tumbuhan, karena tumbuhan muncul dicelah-celah tanah yang terhampar di bumi, dengan demikian dapat diartikan bahwa tumbuhan juga memiliki pasangan untuk dapat memperbanyak diri (berkembangbiak). Dalam hal ini tumbuhan memiliki alat kelamin jantan yang berupa benang sari dan alat kelamin betina berupa putik, dengan adanya benang sari dan putik tumbuhan dapat melakukan penyerbukan sehingga dapat menghasilkan individu baru.

Menurut Al-Qurtubi (2009), mengartikan kata (زوج) adalah *warna* sedangkan kata (كريم) artinya menumbuhkan. Kata (كريم) ini digunakan untuk menggambarkan segala sesuatu yang baik bagi setiap objek yang disifatinya. Tumbuhan yang paling baik, paling tidak adalah subur dan bermanfaat mereka kaum yang kehilangan sarana berfikir, berani menentang Rasul, dan mendustakan Kitabnya, sedang Tuhan-Nyalah yang telah menciptakan bumi dan menumbuhkan di dalamnya tanaman dan buah-buahan berbagai macam dan bentuknya (Ali, *dkk.*, 1989).

Kata (زوج) dalam tumbuhan padat diartikan sebagai pasangan atau jaringan, dari jaringan tersebut maka dapat muncul suatu tumbuhan baru yang berasal dari peleburan antara alat kelamin jantan (benang sari) dan alat kelamin betina berupa putik. Selain itu dapat juga berasal dari bagian vegetatif tumbuhan baik yang di tanam secara langsung atau melalui proses kultur jaringan. Bagian vegetatif tumbuhan yang di tanam dalam media kultur akan membentuk kalus (kumpulan dari sel-sel) selanjutnya menjadi embrio (tersusun oleh jaringan-jaringan) dan tumbuh menjadi tumbuhan baru.

Allah menjelaskan proses kultur jaringan ini tersirat dalam Al-Qur'an surat Al-Waqiah/56 ayat 63-65, sebagai berikut:

أَفَرَأَيْتُمْ مَا تَحْرُثُونَ ﴿٦٣﴾
 وَأَنْتُمْ تَزْرَعُونَهُ أَمْ نَحْنُ الزَّارِعُونَ ﴿٦٤﴾ لَوْ نَشَاءُ
 لَجَعَلْنَاهُ حُطَبًا فَظَلْتُمْ تَفَكَّهُونَ ﴿٦٥﴾

Artinya: “Maka Terangkanlah kepadaku tentang yang kamu tanam. Kamukah yang menumbuhkannya atau kamikah yang menumbuhkannya? Kalau Kami kehendaki, benar-benar Kami jadikan Dia hancur dan kering, Maka jadilah kamu heran dan tercengang (QS. Al-Waqiah/56:62)

Dalam ayat ini, dengan cara mengemukakan pertanyaan, Allah SWT mengungkapkan kepada manusia, yang sebagian besar dari mereka lupa akan keagungan nikmat yang diungkapkan tersebut, walaupun mereka merasakan kelezatan nikmat-nikmat tersebut sepanjang masa. Allah SWT menyampaikan pertanyaan kepada manusia, untuk dipikirkan dan direnungkan mengenai berbagai tanaman yang ditanam oleh manusia, baik tanaman yang di sawah, di ladang, maupun bibit pohon-pohonan yang ditanam di perkebunan. Diungkapkan bahwa bagi semua tanaman tersebut di atas, kedudukan manusia hanya sekadar sebagai penanamnya, pemupuk dan memeliharanya dari berbagai gangguan yang membawa kerugian. Tetapi, kebanyakan manusia lupa terhadap siapakah yang menumbuhkan tanaman tersebut. Siapakah yang menambah panjang akarnya menembus ke dalam tanah. sehingga pohon tersebut dapat berdiri tegak (Depag RI, 2004).

Kemudian dijelaskan pula oleh Allah SWT dalam Al Waqi'ah ayat 65 bahwa walaupun tanaman tersebut sangat baik pertumbuhannya dan buahnya menimbulkan harapan untuk mendatangkan keuntungan berlimpah-limpah,

namun apabila Allah Taala menghendaki yang lain dari pada itu, maka tanaman yang diharapkan itu dapat berubah menjadi tanaman yang tidak berbuah, hampa atau terserang berbagai macam penyakit dan hama (Depag RI, 2004).

Seperti halnya dalam kultur jaringan peneliti berusaha untuk menumbuhkan tanaman baru tetepi Allah-lah yang menentukan apa yang akan terjadi pada eksplan yang ditanam. Seperti yang tersirat dalam ayat tersebut jika Allah menghendaki maka tanaman yang ditanam akan menjadi tanaman baru, jika Allah tidak menghendaki maka eksplan yang ditamana dapat juga terkontamiasi atau eksplan mati.

Kultur jaringan adalah suatu teknik untuk mengisolasi sel, protoplasma jaringan, dan organ kemudian menumbuhkan bagian tersebut pada medium buatan yang mengandung kaya nutrisi dan zat pengatur tumbuh-tumbuhan pada kondisi aseptik, sehingga bagian tersebut dapat memperbanyak diri dan beregenerasi menjadi sel atau tumbuhan sempurna kembali. Prinsip utamanya adalah produksi tanaman dengan menggunakan bagian vegetatif tumbuhan, dengan menggunakan media buatan yang dilakukan di tempat steril (Pandiangan, 2011).

Kultur jaringan merupakan salah satu cara perbanyakan tanaman secara vegetatif. Kultur jaringan merupakan teknik perbanyakan tanaman dengan cara mengisolasi bagian tanaman seperti daun, mata tunas, serta menumbuhkan bagian-bagian tersebut dalam media buatan secara aseptik yang kaya nutrisi dan zat pengatur tumbuh dalam wadah tertutup yang tembus

cahaya sehingga bagian tanaman dapat memperbanyak diri dan beregenerasi menjadi tanaman lengkap. Prinsip utama dari teknik kultur jaringan adalah memperbanyak tanaman dengan menggunakan bagian vegetatif tanaman menggunakan media buatan yang dilakukan di tempat steril (Zulkarnain, 2009).

Manfaat teknik kultur jaringan yang utama adalah memperbanyak klon atau memperbanyak massal dari tanaman yang sifat genetiknya identik satu sama lain. disamping itu, teknik kultur jaringan pun bermanfaat dalam beberapa hal khusus, yaitu memperbanyak klon secara cepat, keragaman genetik, kondisi aseptik, seleksi tanaman, stok tanaman mikro, lingkungan terkendali, pelestarian plasma nutfah, produksi tanaman sepanjang tahun, dan memperbanyak tanaman yang sulit diperbanyak secara vegetatif konvensional (Zulkarnain, 2009).

Menurut Leunufna (2004), konservasi *in vitro* sebagai koleksi aktif dapat diterapkan dengan menggunakan teknik pertumbuhan minimal untuk penyimpanan jangka menengah. Koleksi aktif tersebut dapat dimanfaatkan untuk berbagai keperluan ketika dibutuhkan, seperti memperbanyak tanaman secara massal atau untuk produksi metabolit sekunder secara *in vitro*.

Pada prinsipnya metode kultur jaringan merupakan cara untuk memperbanyak sel atau organ dalam media tumbuh aseptik (yang mengandung formulasi hara buatan) dengan lingkungan yang terkendali. Lestari (2008), menyatakan bahwa prinsip yang mendasari penggunaan metode kultur jaringan adalah pembuktian teori totipotensi sel.

Totipotensi sel adalah kemampuan sel untuk tumbuh dan berkembang menjadi individu baru yang sempurna jika ditempatkan dalam lingkungan yang sesuai dan terkendali (Lestari, 2008). Arah pertumbuhan dan perkembangan suatu sel sangat dipengaruhi oleh lingkungan tumbuhnya, zat pengatur tumbuh yang ditambahkan, serta dipengaruhi oleh media tumbuhnya. Ketepatan pemilihan dan penggunaan media kultur sangat menentukan keberhasilan dalam penggunaan teknik kultur jaringan.

Dua kemungkinan yang terjadi setelah eksplan dikulturkan adalah mengalami pertumbuhan teratur (*organized growth*) dan pertumbuhan tidak teratur (*diorganized growth*). Bentuk-bentuk teratur yang muncul setelah eksplan ditanam pada media kultur nantinya akan berkembang menjadi tunas-tunas kecil yang disebut sebagai tunas aksiler. Kemungkinan lain yang dapat muncul setelah eksplan ditanam pada media kultur adalah mengalami pertumbuhan tidak teratur berupa kumpulan sel yang disebut sebagai kalus (Katuuk, 1989).

2.2.1 Kalus

Kalus adalah suatu kumpulan sel amorphous yang terbentuk dari sel-sel jaringan awal yang membelah diri secara terus-menerus. Pertumbuhan kalus dapat terjadi pada organ tumbuhan yang mengalami luka, sel-sel parenkim yang letaknya berdekatan dengan luka tersebut bersifat meristematik dan dapat membentuk massa sel yang tidak terdiferensiasi (Pandiangan, 2011). Menurut Sumardi (1996), pertumbuhan merupakan

peristiwa pembelahan dan pembesaran sel. Pertumbuhan menunjukkan suatu proses perubahan secara kuantitatif berupa penambahan jumlah sel, ukuran panjang, lebar serta berat dari organisme yang sedang mengalami pertumbuhan. Tumbuhan mengalami pertumbuhan karena sel-selnya bertambah banyak atau mengalami penambahan panjang karena ada perubahan volume serta berat basah atau berat kering yang merupakan perubahan secara kuantitatif. Parameter pertumbuhan sangat bervariasi dan bersifat kuantitatif.

Allah menjelaskan proses pertumbuhan secara tersirat dalam firman-Nya surat Al Insiyiqaaq/84, ayat 19 yang berbunyi:

لَتَرْكَبُنَّ طَبَقًا عَن طَبَقٍ ﴿١٩﴾

Artinya: “*Sesungguhnya kamu melalui tingkat demi tingkat (dalam kehidupan).*” (QS. Al Insiyiqaaq/84: 19)

Kalimat *طَبَقًا عَن طَبَقٍ* memiliki arti tingkat demi tingkat (Yang dimaksud dengan tingkat demi tingkat ialah dari setetes air mani sampai dilahirkan, kemudian melalui masa kanak-kanak, remaja dan sampai dewasa. Dari hidup menjadi mati kemudian dibangkitkan kembali). Dalam konteks tumbuhan kalimat tersebut dapat diartikan bahwa segala sesuatu itu tidak langsung berkembang menjadi dewasa, semuanya mengalami beberapa tahapan dalam pertumbuhan. Seperti halnya kalus juga mengalami tahapan perumbuhan, dimana kalus terbentuk karena adanya eksplan yang berasal dari jaringan meristematik yang mengalami luka, karena adanya zat pengatur tumbuh auksin yang menyebabkan sel pada eksplan tersebut mengalami pemanjangan sel yang tidak diikuti dengan pembelahan sel sehingga

menyebabkan terbentuknya kalus. Setelah kalus terbentuk maka kalus tersebut berregenerasi menjadi embrio lalu muncullah plantlet (tanaman dewasa).

Pertumbuhan kalus dapat digambarkan dalam bentuk kurva sigmoid.

Phillips (1995) membagi lima fase pertumbuhan kalus, yaitu:

1. Fase lag, dimana sel-sel mulai membelah.
2. Fase eksponensial, dimana laju pembelahan sel berada pada puncaknya.
3. Fase linear, pembelahan sel mengalami perlambatan tetapi laju ekspansi sel meningkat.
4. Fase deselerasi, laju pembelahan dan pemanjangan sel menurun.
5. Fase stationer, dimana jumlah dan ukuran sel tetap.

Kalus merupakan sekumpulan sel yang masih aktif tumbuh dan membelah dan belum terdeferensiasi untuk membentuk tunas maupun akar. Ada dua kategori kalus yaitu kompak dan remah. Pada kalus kompak sel-sel teragregasi secara padat, sedangkan kalus remah sel-selnya longgar satu sama lainnya sehingga mudah terurai (Suharijanto, 2011). Menurut Pandiangan (2011), kalus juga dibedakan menjadi dua berdasarkan tekstur dan komposisi tubuhnya yaitu kalus kompak dan meremah. Kalus kompak bertekstur padat dan keras dari sel-sel kecil yang tersusun sangat rapat, sedangkan kalus meremah bertekstur lunak dan tersusun dari sel-sel dengan ruang sel yang banyak. Perbedaan tekstur kalus menimbulkan adanya perbedaan kemampuan untuk memproduksi metabolit sekunder lebih banyak dari kalus meremah.

Turhan (2004), menyatakan bahwa tekstur kalus dapat dibedakan menjadi tiga macam, yaitu: kompak (*non friable*), intermediet dan remah

(*friable*). Syahid (2010), penggunaan 2,4-D secara tunggal pada semua konsentrasi yang diaplikasikan menghasilkan kalus dengan struktur sebagian remah (*friable*) dan sebagian kompak. Kalus dengan struktur remah (*friable*) merupakan kalus yang terbentuk dari sekumpulan sel yang mudah lepas sedangkan kalus kompak terdiri dari sekumpulan sel yang kuat. Struktur kalus remah sangat berkorelasi dengan kecepatan daya tumbuh kalus sehingga produksi metabolit sekunder tertentu yang ingin diperoleh lebih cepat dicapai.

2.2.2 Faktor-Faktor Yang Menentukan Keberhasilan Kultur *In Vitro*

Proses kultur dipengaruhi oleh beberapa faktor. Kultur jaringan akan berhasil dengan baik apabila memenuhi syarat yang meliputi pemilihan eksplan, penggunaan media yang cocok dan keadaan yang aseptik serta pengaturan udara yang baik (Nugroho dan Sugito, 2004).

2.2.2.1 Pemilihan Eksplan

Pertumbuhan dan morfogenesis dalam mikropropagasi sangat dipengaruhi oleh keadaan jaringan tanaman yang digunakan sebagai eksplan. Selain faktor genetis eksplan yang telah disebutkan di atas, kondisi eksplan yang mempengaruhi keberhasilan teknik mikropropagasi adalah jenis eksplan, ukuran, umur dan fase fisiologis jaringan yang digunakan sebagai eksplan. Meskipun masing-masing sel tanaman memiliki kemampuan totipotensi, namun masing-masing jaringan memiliki kemampuan yang

berbeda-beda untuk tumbuh dan beregenerasi dalam kultur jaringan (Fatimah, 2011).

Gunawan (1995), menyatakan bagian tanaman yang dapat digunakan sebagai eksplan adalah: pucuk muda, batang muda, daun muda, kotiledon, hipokotil. Pada umumnya eksplan yang digunakan dalam perbanyakan tanaman purwoceng (*Pimpinella alpina* Molck.) yaitu daun (Roostika, *et.al.*, 2007), daun dan tangkai daun (petiol) pada media DKW (Darwati, 2007).

2.2.2.2 Media Kultur Jaringan

Keberhasilan dalam teknologi serta penggunaan metode *in vitro* terutama disebabkan penggunaan yang lebih baik tentang kebutuhan hara sel dan jaringan yang dikulturkan. Hara terdiri dari komponen utama dan komponen tambahan. Komponen utama meliputi garam mineral, sumber karbon (gula), vitamin dan pengatur tumbuh. Komponen lain seperti senyawa nitrogen organik, berbagai asam organik, metabolit dan ekstrak tambahan tidak mutlak, tetapi dapat menguntungkan ketahanan sel dan perbanyakannya (Wetter, 1991).

Media yang digunakan pada kultur jaringan mempunyai komposisi dari beberapa komponen seperti garam, vitamin, asam amino, zat pengatur tumbuh, gula, agar atau gelriteTM dan aquades. Semua komponen memenuhi satu atau lebih pada pertumbuhan tanaman secara *in vitro* (Teves, 2010). Widiastoety dan Syafril, (1993), menjelaskan bahwa media kultur jaringan yang memenuhi syarat adalah yang mengandung unsur hara makro dan mikro

dalam kadar dan perbandingan tertentu, sumber energi seperti sukrosa, vitamin, dan zat pengatur tumbuh. Kadang-kadang diperlukan pula penambahan bahan-bahan organik seperti air kelapa, ragi atau ekstrak malt. Keseimbangan yang tepat dari komponen-komponen tersebut akan tampak pada tipe pertumbuhan yang terjadi.

Media kultur jaringan yang paling banyak digunakan untuk berbagai tujuan kultur jaringan adalah media dasar Murashige dan Skoog (1962). Walaupun pada awal mulanya unsur-unsur makro dalam media MS dibuat untuk kultur kalus tembakau, tetapi komposisi MS ini juga mendukung dan sesuai untuk hampir semua kultur jaringan tanaman. Media MS mengandung unsur makro dengan konsentrasi relatif tinggi terutama unsur N yang diberikan dalam bentuk NO_3^- dan NH_4^+ (nitrat dan amonium) (Karmanah, 2009).

Murashige dan Skoog (MS) (1962), komposisi garam diperlukan secara luas, terutama jika objek yang diinginkan adalah regenerasi tanaman. Komposisi dari media ini tidak hanya bahan-bahan yang diperlukan tapi juga unsur-unsur lain contoh, nitrogen, phosphorus, potassium, dan kalsium dan magnesium.

Media MS mengandung 40 mM N dalam bentuk NO_3 dan 29 mM N dalam bentuk NH_4^+ . Kandungan N ini, lima kali lebih tinggi dari N total yang terdapat pada media Miller, 15 kali lebih tinggi dari media tembakau Hildebrant, dan 19 kali lebih tinggi dari media White. Kalium juga ditingkatkan sampai 20 mM, sedangkan P, 1.25 mM. Unsur makro lain

konsentrasinya dinaikkan sedikit. Pertama kali unsur makro dalam media MS dibuat untuk kultur kalus tembakau, tetapi komposisi MS ini sudah umum digunakan untuk kultur jaringan jenis tanaman lain (Erwin, 2009). Komposisi media Murashige dan Skoog (1962) dapat dilihat pada (Lampiran 1).

Menurut Winata (1988), unsur hara makro digunakan pada semua jenis media, sedangkan hara mikro berbeda-beda komposisinya sesuai jenis media. Lebih lanjut dijelaskan bahwa unsur hara yang disediakan dalam media sebenarnya merupakan kebutuhan pokok bagi tanaman yang tumbuh di lapangan yang tersedia didalam tanah. Unsur-unsur hara ini diberikan ke dalam media dalam bentuk garam-garam anorganik. Selanjutnya sejalan dengan perkembangan teknik kultur jaringan tanaman, komposisi media bervariasi sesuai dengan tujuan kultur.

2.2.2.3 Lingkungan Tumbuh

Lingkungan tumbuh memiliki peranan yang penting dalam keberhasilan proses kultur jaringan yang meliputi, meliputi:

1) Suhu

Kebutuhan suhu untuk masing-masing jenis tanaman umumnya berbeda-beda. Tanaman dapat tumbuh dengan baik pada suhu optimumnya. Pada suhu ruang kultur dibawah optimum, pertumbuhan eksplan lebih lambat, namun pada suhu diatas optimum pertumbuhan tanaman juga terhambat akibat tingginya laju respirasi eksplan. Suhu yang digunakan adalah konstan, yaitu 25°C (kisaran suhu 17-32°C). Tanaman tropis umumnya dikulturkan

pada suhu yang sedikit lebih tinggi dari tanaman empat musim, yaitu 27°C (kisaran suhu 24-32°C). Bila suhu siang dan malam diatur berbeda, maka perbedaan umumnya adalah 4-8°C, variasi yang biasa dilakukan adalah 25°C siang dan 20°C malam, atau 28°C siang dan 24°C malam (Fatimah, 2011). Darwati (2007), menyatakan bahwa suhu inkubasi untuk menginduksi kalus Purwoceng yaitu 16-18⁰ C.

2) Kelembaban

Kelembaban relatif dalam botol kultur dengan mulut botol yang ditutup umumnya cukup tinggi, yaitu berkisar antara 80-99%. Jika mulut botol ditutup agak longgar maka kelembaban relatif dalam botol kultur dapat lebih rendah dari 80%. Sedangkan kelembaban relatif di ruang kultur umumnya adalah sekitar 70%. Jika kelembaban relatif ruang kultur berada dibawah 70% maka akan mengakibatkan media dalam botol kultur (yang tidak tertutup rapat) akan cepat menguap dan kering sehingga eksplan dan plantlet yang dikulturkan akan cepat kehabisan media. Namun kelembaban udara dalam botol kultur yang terlalu tinggi menyebabkan tanaman tumbuh abnormal yaitu daun lemah, mudah patah, tanaman kecil-kecil namun terlampau sukulen (berair). Kondisi tanaman demikian disebut vitrifikasi atau *hiperhidrociti* (Gunawan, 1987).

3) Cahaya

Pertumbuhan eksplan dalam kultur *in vitro* dipengaruhi oleh kuantitas dan kualitas cahaya (intensitas), lama penyinaran dan panjang gelombang cahaya. Pertumbuhan Padaperbanyakan tanaman secara *in vitro*, kultur

umumnya diinkubasikan pada ruang penyimpanan dengan penyinaran. Tunas-tunas umumnya dirangsang pertumbuhannya dengan penyinaran, kecuali pada teknik perbanyakan yang diawali dengan pertumbuhankalus. Sumber cahaya pada ruang kultur ini umumnya adalah lampu fluorescent (TL). Hal ini disebabkan karena lampu TL menghasilkan cahaya warna putih, selain itu sinar lampu TL tidak meningkatkan suhu ruang kultur secara drastis (hanya meningkat sedikit). Intensitas cahaya yang digunakan pada ruang kultur umumnya jauh lebih rendah ($1/10$) dari intensitas cahaya yang dibutuhkan tanaman dalam keadaan normal. Intensitas cahaya dalam ruang kultur untuk pertumbuhan tunas umumnya berkisar antara 600-1000 lux. Perkecambahan dan inisiasi akar umumnya dilakukan pada intensitas cahaya lebih rendah (Fatimah, 2011).

Selain intensitas cahaya, lama penyinaran atau photoperiodisitas juga mempengaruhi pertumbuhan eksplan yang dikulturkan. Lama penyinaran umumnya diatur sesuai dengan kebutuhan tanaman sesuai dengan kondisi alamiahnya. Periode terang dan gelap umumnya diatur pada kisaran 8-16 jam terang dan 16-8 jam gelap tergantung varietas tanaman dan eksplan yang dikulturkan. Periode siang/malam (terang/gelap) ini diatur secara otomatis menggunakan timer yang ditempatkan pada saklar lampu pada ruang kultur. Dengan teknik ini penyinaran dapat diatur konstan sesuai kebutuhan tanaman (Djenal, 2000 dalam Syafiatul, 2011). Darwati (2007), periode terang gelap dalam induksi kalus Purwoceng yaitu 16 jam terang dan 6 jam gelap.

2.3 Zat Pengatur Tumbuh

Kehadiran zat pengatur tumbuh dalam kultur jaringan sangat nyata pengaruhnya. Sangat sulit untuk menerapkan teknik kultur jaringan pada upaya perbanyakan tanaman tanpa melibatkan zat pengatur tumbuhnya (Zulkarnain, 2009).

Zat pengatur tumbuh (ZPT) pada tanaman adalah senyawa organik yang bukan termasuk unsur hara (nutrisi), yang dalam jumlah sedikit dapat mendukung (*promote*), menghambat (*inhibit*) dan dapat merubah proses fisiologis tumbuhan. Zat pengatur tumbuh pada tanaman terdiri dari lima kelompok yaitu auxin, gibberellin, cytokinin, ethylene dan inhibitor dengan ciri khas dan pengaruh yang berlainan terhadap proses fisiologi. Pada kultur kalus zat pengatur tumbuh yang biasanya dipakai adalah dari golongan auksin dan sitokinin (Abidin, 1983). Jadi zat pengatur tumbuh merupakan suatu persenyawaan organik yang dalam jumlah sedikit (1 mM) dapat merangsang, menghambat atau mengubah pola pertumbuhan dan perkembangan tanaman.

Menurut Abidin (1983), auksin adalah salah satu hormon tumbuh yang tidak terlepas dari proses pertumbuhan dan perkembangan. Pembesaran sel dapat diaturoleh auksin, giberelin, sitokinin dan beberapa zat penghambat, di alam stimulasi auksin pada organ pucuk suatu tanaman. Auksin (NAA, IAA, IBA, dan auksin lainnya) berperan pada berbagai aspek pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Menurut Wardani (2004), penambahan 2,4-D dalam media ternyata efektif untuk meningkatkan laju pertumbuhan kalus

sehingga 2,4-D merupakan ZPT yang paling potensial untuk menginduksi kalus.

Auksin dapat membantu pemanjangan sel, pembelahan sel dan pembentukan akar. Konsentrasi auksin yang rendah dapat meningkatkan pembentukan akar adventif, sedangkan konsentrasi tinggi dapat merangsang kalus dan menekan morfogenesis. Yang paling banyak digunakan adalah IAA (Indol 3 acetic acid) yang disintesa pada bagian tertentu seperti daun muda dan biji yang sedang berkembang. Sedangkan auksin sintetik yang biasa digunakan adalah 2,4-D (Zulkarnain, 2009).

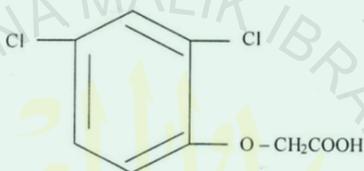
2.3.1 ZPT 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid)

2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) merupakan jenis dari auksin sintetik yang banyak ditambahkan ke dalam media kultur jaringan (Gambar 2.2). 2,4-D merupakan senyawa sintesis yang dapat digunakan sebagai zat pengatur tumbuh maupun sebagai herbisida. Pemberian 2,4-D dalam jumlah kecil dapat memberikan respon pertumbuhan tapi jika diberikan dalam jumlah yang banyak dapat berfungsi sebagai herbisida yang menyebabkan kematian pada jaringan. Menurut Hendaryono dan Wijayani (1994), 2,4-D bersifat stabil karena ZPT ini tidak mudah mengalami kerusakan jika terkena cahaya maupun pemanasan pada saat sterilisasi.

2,4-D sebagai auksin menyebabkan perluasan dan pemanjangan sel tidak terjadi tetapi memicu pembelahan sel. Pembelahan sel yang berlebihan dan tidak diikuti dengan perluasan dan pemanjangan mengakibatkan

terjadinya kalus. Pemberian 2,4-D pada medium dasar kultur *in-vitro* dapat menginduksi kalus dan menyebabkan pertumbuhan kalus terus berlangsung (Krinkorian 1995 dalam Darwati, 2007).

2,4-D merupakan auksin kuat yang sering digunakan secara tunggal untuk menginduksi terbentuknya kalus dari berbagai jaringan tanaman (Bhojwani dan Razdan, 1996 dalam Syahid, 2007). Pemberian ZPT 2,4-D secara tunggal dapat merespon terjadinya inisiasi pembentukan kalus.



Gambar 2.2 Struktur Molekul Asam 2,4- *Dichlorophenoxyacetic acid* (2,4-D) (Zulkarnain, 2009)

2.3.2 Kajian Riset ZPT 2,4-D (2,4-*Dichlorophenoxyacetic Acid*)

Penggunaan ZPT 2,4-D dalam kultur jaringan tumbuhan telah banyak dilaporkan. Konsentrasi ZPT 2,4-D yang sering digunakan bervariasi tergantung jenis tanaman. Berdasarkan hasil penelitian pada *Acalypha indica* L. penambahan 2,4-D sebanyak 3 mg/L 2,4-D efektif untuk memacu pertumbuhan kalus *Acalypha indica* L. tetapi belum mampu meningkatkan senyawa kimia alami flavonoid (Rahayu, 2003). Sulistyawati (2011), hasil penelitian menunjukkan zat pengatur tumbuh 2,4-D dapat menginduksi waktu pembentukan kalus Daun ungu. Waktu induksi tercepat 9 hari dengan perlakuan hormon 2,4-D konsentrasi 1,5 mg/l dalam keadaan terang.

Penambahan 2,4-D (1,3,5 ppm) secara independen tertinggi terhadap berat basah kalus yaitu pada eksplan daun 3 ppm dan eksplan petiol 1 ppm tetapi tidak memberi pengaruh nyata terhadap pertumbuhan kalus Purwoceng pada media DKW (Darwati, 2007). Menurut Uddin *et.al*, (2006), Induksi kalus *Stevia rebaudiana* Bert. pada media MS menunjukkan hasil terbaik pada konsentrasi 2,4-D 3 mg/L. Amitava, *et.al* (2008), induksi kalus *Gymnema sylvestris* R.Br. terbaik terjadi pada 2,4-D dengan kombinasi Kinetin (1 – 5 mg l⁻¹:1 mg l⁻¹). Media MS + 2,4-D 2.0 mg/L sangat baik untuk pertumbuhan bobot biomassa kalus, ukuran kalus dan persentase terbentuk kalus pada varietas Tapaktuan (Suseno, 2007).

2.4 Metabolit Sekunder

Metabolit sekunder adalah senyawa produk atau hasil metabolisme sekunder. Metabolisme sekunder memanfaatkan metabolit primer pada awal dalam jalur metabolismenya (Pandiangan, 2011).

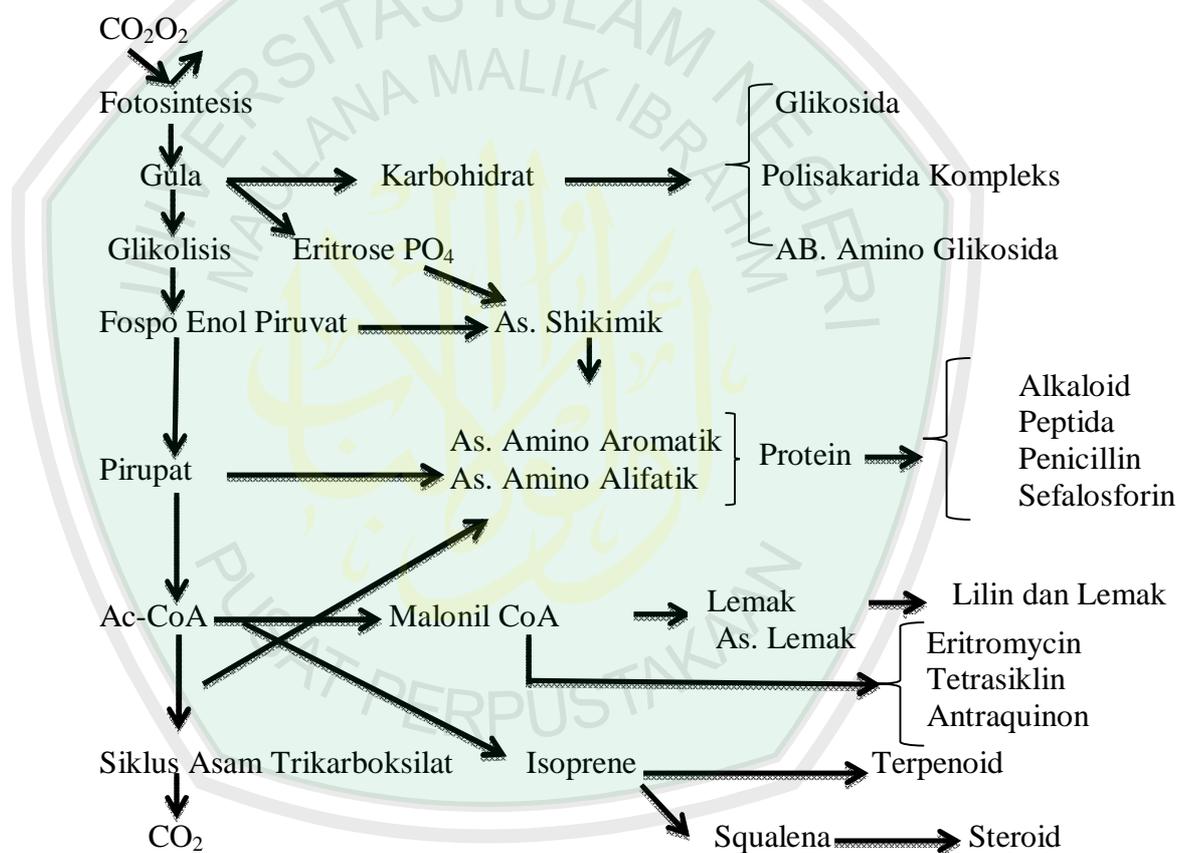
Metabolit sekunder merupakan hasil dari metabolisme tanaman yang bukan hasil metabolisme utama. Pada tanaman tingkat tinggi menghasilkan tingkat metabolit sekunder yang beragam. Kandungan metabolit sekunder juga dipengaruhi oleh keadaan lingkungan tempat tumbuhan tersebut hidup. Herbert (1995), metabolit sekunder merupakan hasil metabolisme yang memiliki karakteristik khusus untuk setiap makhluk hidup dan dibentuk melalui jalur khusus dari metabolit primer seperti karbohidrat, lemak, asam amino. Metabolit sekunder dibentuk untuk meningkatkan pertahanan diri.

Tumbuhan pada kondisi yang normal tanaman hanya bisa mensintesis sedikit metabolit sekunder, tapi bagaimana jika tanaman diperlakukan pada beberapa keadaan yang berbeda seperti pencahayaan dan stres cahaya (gelap) dan berbagai konsentrasi hormon. Untuk mendapatkan metabolit sekunder yang dihasilkan dalam jaringan tanaman, dapat juga dalam sel-sel yang dilakukan dengan cara teknik kultur jaringan (Nugroho dan Sugito, 2004).

Sintesis metabolit sekunder merupakan salah satu fungsi protektif tanaman ketika ada beberapa patogen dengan meningkatkan fitoaleksin. Mekanisme pertahanan tanaman meliputi: 1) deteksi sinyal patogen, 2) aktivasi H^+ -ATPase, 3) peningkatan aliran kalsium ke dalam sel, 4) aktivasi CDPK (*calcium strep dependent proteinkinase*), 5) aktivasi NADPH oksidase. Radikal oksigen yang aktif dihasilkan oleh NADPH oksidase yang akan mengaktifkan MAP kinase sehingga terjadi peningkatan tingkat ekspresi gen biosintesis metabolit sekunder (Bulgakov *et.al.*, 2003).

Jalur metabolisme primer biasanya merupakan jalur umum yang terdapat pada semua organisme, sedangkan jalur metabolisme sekunder merupakan jalur khusus untuk masing-masing spesies. Menurut Sastrohamirdjojo (1996), menyatakan bahwa pada dasarnya tidak ada perbedaan yang tajam antara metabolit primer dengan metabolit sekunder. Gula-gula yang lazim seperti, glukosa, fruktosa, manosa dimasukkan dalam metabolit primer sedangkan gula-gula yang lebih spesifik seperti, khalkosa, steptosa, mikaminosa yang diketahui sebagai konstituen antibiotic dikategorikan sebagai metabolit sekunder.

Metabolit sekunder yang terdapat pada bahan alam merupakan hasil metabolit primer yang mengalami reaksi yang spesifik sehingga menghasilkan senyawa-senyawa tertentu. Senyawa metabolit primer merupakan senyawa awal atau senyawa induk atau dikenal sebagai *precursor* untuk metabolit sekunder. Berikut ini adalah bagan yang menunjukkan hubungan antara metabolit primer dengan metabolit sekunder (Gambar 2.3).



Gambar 2.3 Bagan Hubungan Metabolit Primer Menjadi Metabolit Sekunder (Sastrohamirdjojo, 1996)

2.4.1 Produksi Senyawa Metabolit Sekunder Melalui Teknik Kultur Jaringan

Teknik kultur jaringan merupakan salah satu cara untuk meningkatkan produksi metabolit sekunder. Teknik ini ditujukan pada budidaya secara *in*

vitro terhadap berbagai bagian tanaman yang meliputi batang, daun, akar, bunga, kalus, sel, protoplas dan embrio. Bagian-bagian tersebut yang diistilahkan sebagai eksplan, diisolasi dari kondisi *in vivo* dan dikultur pada medium buatan yang steril sehingga dapat beregenerasi dan berdeferensiasi menjadi tanaman lengkap (Zulkarnain, 2009).

Kultur jaringan dapat digunakan sebagai sarana penghasil metabolit sekunder. Hal ini disebabkan karena metabolit sekunder merupakan hasil dari proses-proses biokimia yang terjadi dalam tubuh tanaman, sedangkan proses tersebut juga terjadi pada kultur jaringan. Senyawa ini terdapat pada kalus atau bagian yang lain, misalnya akar (Dalimonthe, 1987 dalam Parti, 2004).

Produksi metabolit sekunder dengan menggunakan teknik *in vitro* memiliki keuntungan dibandingkan dengan teknik konvensional antara lain senyawa sekunder yang dihasilkan dapat diproduksi pada lingkungan yang terkendali, bebas dari deraan lingkungan, bebas dari hama, dapat mengasilkan senyawa spesifik, produksi dapat dilakukan sesuai kebutuhan, kalitas dan produksinya dapat lebih komsisten serta lahan yang dibutuhkan tidak luas, mengurangi upah buruh (Dalimonthe, 1987 dalam Darwati, 2007).

Menurut Rahmawati (1999), sebelum inisiasi kultur jaringan, terjadi 3 fase, 1) fase penyesuaian, fase 2) fase pembelahan sel, fase 3) fase stasioner (fase dimana tidak ada lagi pertumbuhan). Senyawa metabolit sekunder biasanya terbentuk pada fase stasioner, sebagai akibat keterbatasan nutrisi dalam medium akan merangsang dihasilkannya enzim-enzim yang berperan untuk pembentukan metabolit sekunder dengan memanfaatkan metabolit

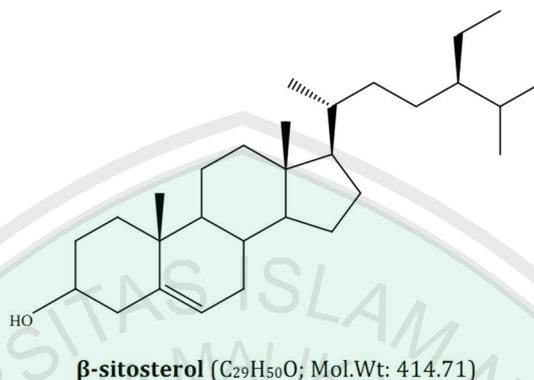
primer guna mempertahankan kelangsungan hidup. Produksi metabolit sekunder pada fase stasioner ini mungkin juga disebabkan adanya peningkatan vakuola sel untuk akumulasi senyawa tinggi.

Pemanfaatan kultur sel untuk produksi agro industri, telah banyak digunakan, dan telah dilakukan secara komersial sejak tahun 1950, seperti perbanyakan sel tembakau dan sayur-sayuran yang telah dilakukan sejak akhir tahun 1950an dan awal tahun 1960an di US, Canada dan Eropa. Senyawa-senyawa seperti shikonin dan saponin ginseng sudah diproduksi dalam skala industri di Jepang, sedangkan beberapa senyawa lain juga diproduksi di Eropa (Misawa, 1994). Dari hasil penelitian yang telah dilakukan oleh Syahid dan Hadipoentyanti (2002), kandungan kurkumin tanaman temulawak hasil kultur *in vitro*, ternyata lebih tinggi dibandingkan koleksi plasma nutfah yang diperbanyak secara konvensional.

2.4.2 Senyawa Sitosterol

Tiga macam senyawa yang biasa disebut sebagai "fitosterol" yaitu sitosterol (lebih dikenal sebagai β -sitosterol), stigmasterol dan campesterol terbukti bisa ditemukan pada beberapa jenis tanaman tinggi. Sitosterol merupakan senyawa turunan sterol. Sitosterol banyak ditemukan dalam buah-buahan, sayuran, kacang-kacangan, dan biji. β -sitosterol adalah salah satu dari beberapa fitosterol (sterol) dengan struktur kimia mirip dengan kolesterol. Menurut Robinson (1995), β -sitosterol memiliki rotasi jenis -45° - -30° dan

memiliki jumlah atom karbon 29 dengan struktur ikatan rangkap pada atom C 5,6 (Gambar 2.4).



Gambar 2.4 struktur sitosterol (Kamboj, 2011)

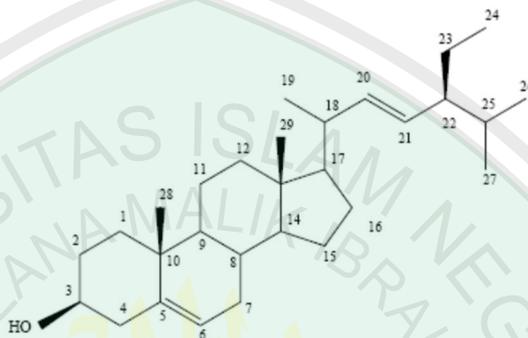
Senyawa-senyawa yang merupakan metabolit sekunder berkhasiat afrodisiak dalam tanaman purwoceng antara lain sterol (sitosterol dan stigmasterol), saponin, dan bergapten (Ma'mun *et.al*, 2006).

Sitosterol memiliki banyak manfaat, kehadiran beta-sitosterol di dalam hati akan mempercepat rusaknya enzim spesifik yang dibutuhkan hati untuk memproduksi kolesterol, atau secara tidak langsung menghambat pembentukan kolesterol di hati. β-sitosterol memiliki struktur kimia yang hampir sama dengan kolesterol sehingga bisa menghambat absorpsi kolesterol oleh darah. Kolesterol yang tidak terabsorpsi oleh darah tersebut kemudian akan terekskresikan keluar tubuh (Tisnadaja *et.al*, 2006).

2.4.3 Senyawa Stigmasterol

Stigmasterol merupakan steroida dengan jumlah atom karbon 29, dengan rotasi jenis -70° - -90° dan memiliki struktur ikatan rangkap pada atom C 5,6 dan 22,3 (Robinson, 1995). Stigmasterol mempunyai gugus OH terikat pada atom carbon ke 3 dari inti *siklo pentane prehidrofenenteren*,

sehingga mampu mengadakan ikatan dengan oligosakarida yang membentuk saponin steroid. Ikatan glikosida tersebut menyebabkan senyawa kimia mudah larut dalam air (Suzery *et al.* 2004). Struktur dari stigmasterol adalah sebagai berikut (Gambar 2.5).



Stigmasterol ($C_{29}H_{48}O$; Mol.Wt. 412.69)

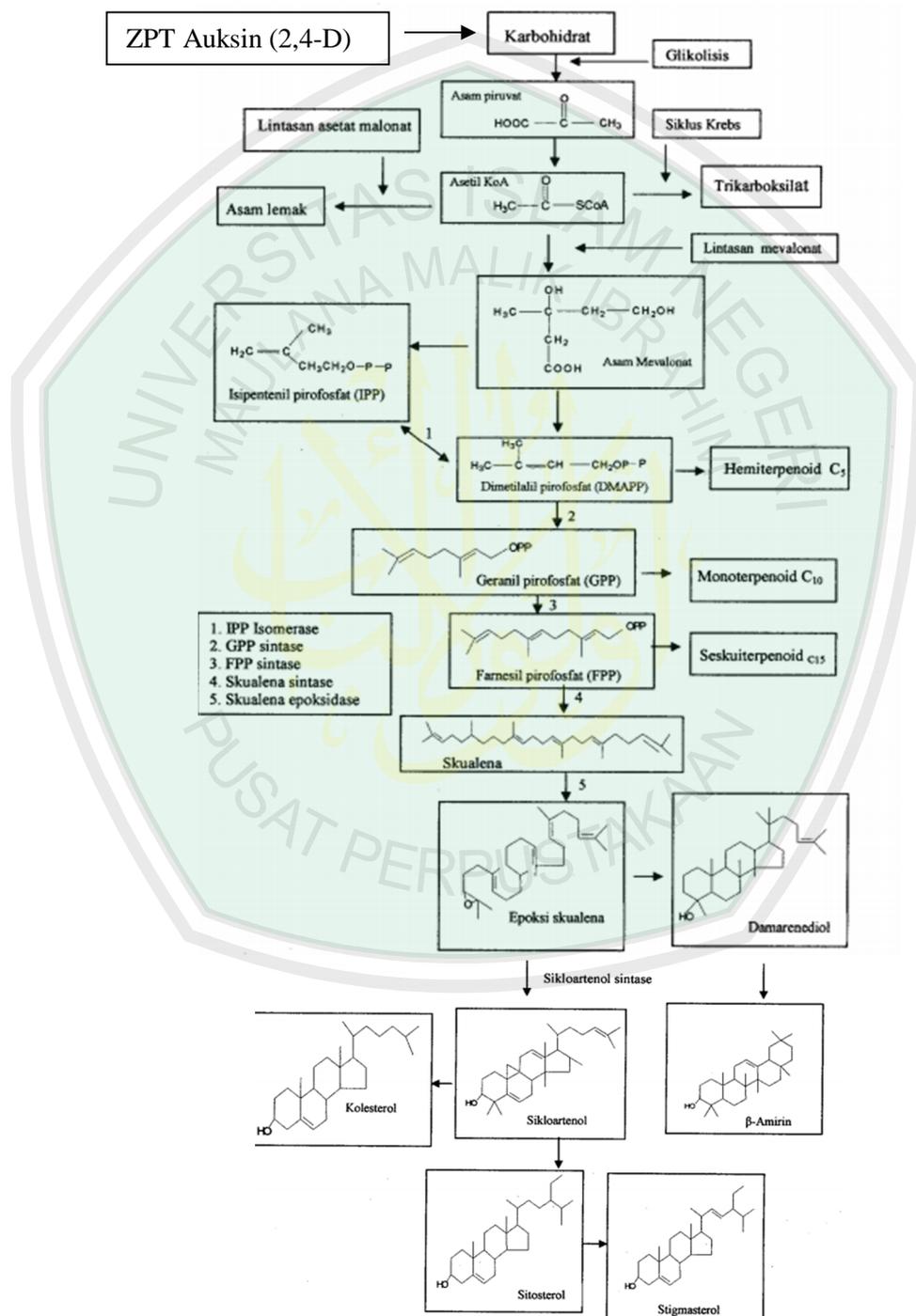
Gambar 2.5 struktur stigmasterol (Kamboj, 2011)

Senyawa yang dihasilkan tumbuhan Purwoceng adalah sitosterol, stigmasterol, atau saponin, senyawa tersebut melalui lintasan mevalonat. Perkusor utama untuk membentuk senyawa tersebut adalah asam mevalonat (Vickery dan Vickert, 1981 dalam Darwati, 2007).

2.4.4 Biosintesis Sitosterol dan Stigmasterol

Biosintesis metabolit sekunder dipengaruhi oleh kondisi saat pertumbuhannya dan pembentukannya, dimana kondisi optimal pada kedua fase mungkin berbeda. Pada fase tertentu perlakuan media kultur baik secara fisik dan kimia dapat meningkatkan kandungan metabolit sekunder (Thorpe, 1990 dalam Darwati, 2007). Tumbuhan Purwoceng menghasilkan senyawa stigmasterol dan sitosterol. Biosintesis senyawa tersebut terbentuk melalui

lintasan mevalonat, dimana molekul karbohidrat dari hasil metabolit primer diubah menjadi sitosterol dan stigmasterol. Skema biosintesis senyawa stigmasterol dan sitosterol Gambar 2.6 (Croteu, 2000):



Gambar 2.6 Biosintesis sitosterol dan stigmasterol (Croteu *et al*, 2000 dalam Darwati, 2007)

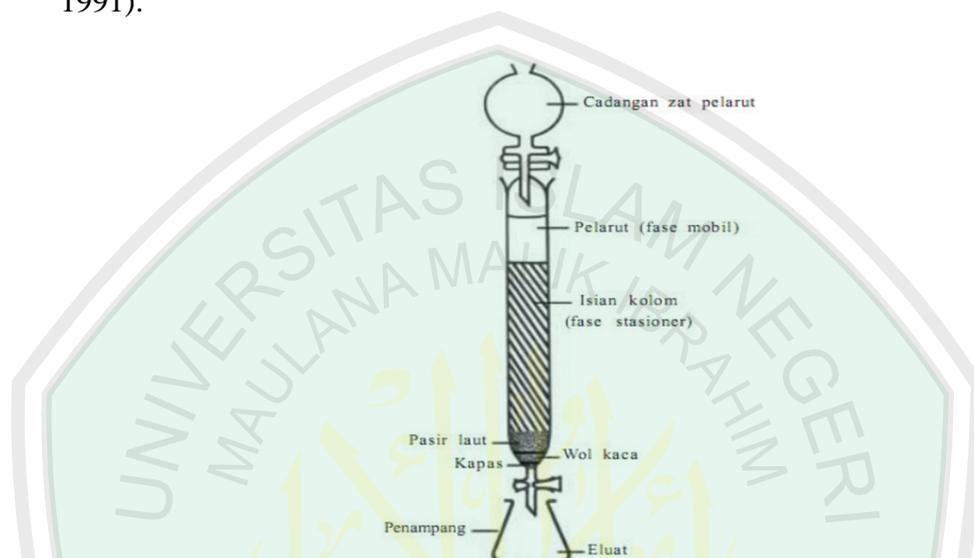
2.5 Ekstraksi Dan Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Dengan Kromatografi Kolom

Ekstraksi adalah kegiatan penarikan kandungan kimia yang dapat larut sehingga terpisah dari bahan yang tidak larut dengan pelarut cair. Senyawa aktif yang terdapat dalam berbagai simplisia dapat digolongkan ke dalam golongan minyak atsiri, alkaloid, flavonoid, steroid dan lain-lain. Dengan diketahuinya senyawa aktif yang dikandung simplisia akan mempermudah pemilihan pelarut dan cara ekstraksi yang tepat (BPOM, 2000). Ekstraksi senyawa sitosterol dan stigmasterol dilakukan dengan sistem refluks dimana pelarut n-heksan digunakan sebagai pengekstraksi.

Analisis kualitatif pada tumbuhan meliputi dua tahapan yaitu isolasi/ ekstraksi dan identifikasi kandungan sekunder dalam jenis tumbuhan khusus. Analisis ini juga digunakan untuk menentukan ciri senyawa aktif penyebab efek racun atau efek yang bermanfaat (Harborne, 1987). Dalam hal ini cara ekstraksi dilakukan guna melacak senyawa steroid (stigmasterol dan sitosterol) yang terkandung dalam kalus Purwoceng. Terdapat beberapa metode dan alat yang digunakan dalam analisis kualitatif metabolit sekunder, salah satunya yaitu dengan menggunakan kromatografi kolom (LC).

Kromatografi kolom merupakan salah satu jenis kromatografi cair. Fase diam, baik bahan yang jerap (KCP) atau film zat cair pada penyangga (KCC), ditempatkan di dalam tabung keca berbentuk silinder (Gambar 2.7). Kromatografi kolom merupakan metode kromatografi untuk pemisahan campuran dalam jumlah besar. Campuran yang akan dipisahkan diletakkan berupa pita diatas bagian penyerap yang berada pada tabung kaca. Fasa gerak

dibiarkan mengalir melalui kolom disebabkan oleh gaya berat. Pita senyawa yang terlarut bergerak melalui kolom dengan laju yang berbeda, memisah dan dikumpulkan berupa fraksi-fraksi pada saat keluar dari alas kolom (Gritter, 1991).



Gambar 2.7 Alat Kromatografi Kolom (Gritter, 1991)

Kromatografi kolom merupakan salah satu jenis pemisahan dengan menggunakan prinsip aliran zat cair (pelarut) yang dipengaruhi oleh gaya tarik bumi (gravitasi bumi) biasanya terbuat dari kaca yang dilengkapi keran jenis tertentu pada bagian bawahnya untuk mengatur aliran pelarut. Untuk kolom gaya tarik bumi yang memakai penjerap berukuran 60-230 mesh (63-250 μm), umumnya laju aliran sekitar 10-20 mL/cm² penampang kolom/jam. Untuk partikel yang lebih kecil dari 200 mesh diperlukan semacam pemompaan atau sistem bertekanan. Kemudian laju dapat ditingkatkan sampai 2 mL atau lebih setiap menitnya, atau sampai batas sistem tekanan (Gritter, 1991). Larutan yang keluar dari kromatografi kolom selanjutnya dilakukan analisis dengan menggunakan spektrofotometri.