

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Pegagan

2.1.1 Klasifikasi

Menurut Soenanto (2009), berdasarkan sistem taksonomi, tanaman pegagan dikenal dengan nama ilmiah *Centella asiatica* L.Urban famili Umbelliferae. Adapun klasifikasinya adalah:

Kingdom Plantae

Divisi Spermatophyta

Kelas Dicotyledoneae

Ordo Umbellales

Famili Umbelliferae (apiaceae)

Genus *Centella*

Spesies *Centella asiatica* L.urban

Pegagan di Indonesia mempunyai banyak nama lokal, antara lain : antanan (Sunda), daun kaki kuda, pagago ambun, pegaga, daun aga, pugago (Sumatera), gagan-gagan, gangganan, kerok batok, pacul gowang (Jawa), kos-tekosan (Madura), pagaga, daun tungke-tungke, wisu-wisu, kisu-kisu (Sulawesi), kori-kori (Halmahera), kolotidi, sarowti (Maluku), serta bebele, penggaga paiduh (Nusa Tenggara). Pegagan secara internasional dikenal dengan nama gotu cola, indian pennywort, ji xue cao (Winarto, 2003).

2.1.2. Deskripsi Tanaman

Pegagan (*Centella asiatica* L.Urbn) merupakan tanaman yang dikenal juga dengan nama rumput kaki kuda atau antanan, tersebar didaerah beriklim tropis mulai dari dataran rendah sampai dengan dataran tinggi 2500 m dpl dan tumbuh subur di tempat – tempat terbuka. Pegagan adalah tanaman terna tanpa batang, menjalar, pendek tanpa kayu akar. Di Indonesia tanaman pegagan banyak ditemukan tumbuh secara liar di pematang, selokan – selokan yang kering, di sela-sela bebatuan dan di pingir – pinggir jalan (Rahardjo *et al* 1999).

Pegagan tumbuh merayap menutupi tanah, tidak berbatang, tinggi tanaman antara 10 – 50 cm, memiliki daun satu helaian yang tersusun dalam roset akar dan terdiri dari 2 – 10 helai daun. Daun berwarna hijau, berbentuk seperti kipas, buah pinggang atau ginjal, permukaan dan punggungnya licin, tepinya agak melengkung keatas, bergerigi dan kadang – kadang berambut. Tangkai daun berbentuk seperti pelepah, sepanjang tangkai daun beralur dan di pangkalnya terdapat daun sisik yang sangat pendek, licin, tidak berbulu, berpadu dengan pangkal tangkai daun. Tangkai bunga tersusun dalam karangan seperti payung, berwarna putih sampai merah muda. Bentuk bunga bundar lonjong, cekung dan runcing ke ujung dengan ukuran sangat kecil. Buah pegagan berukuran kecil, berbentuk lonjong atau pipih, menggantung, baunya wangi, rasanya pahit, berdinding agak tebal, kulitnya keras, dan berwarna kuning. Akarnya rimpang dengan banyak stolon. Akar keluar dari buku– buku dan tumbuh masuk kedalam tanah. Akar berwarna agak kemerah– merahan (Winarto,2003).



Gambar 2.1. Morfologi Pegagan (*Centella asiatica* L.Urban)(Mora,2012)

Pegagan dapat diperbanyak secara vegetatif dengan tunas berakar dan dapat pula diperbanyak dengan biji atau secara generatif. Hingga saat ini perbanyakan menggunakan stek tunas berakar lebih banyak dilakukan dibandingkan perbanyakan dengan biji. Perbanyakan dengan biji atau benih jarang dan bahkan belum pernah dilakukan, selain karena ukuran bijinya terlalu kecil juga sulit untuk mendapatkan biji tersebut (Januwati & Muhammad 1992).

2.1.3. Khasiat Penggunaan dan Kandungan Senyawa Aktif

Pegagan dapat mengobati beberapa penyakit. Pegagan berkhasiat untuk obat batuk, susah tidur, tuberkulosa, peluruh air seni, kencing darah, sariawan, demam, nafsu makan berkurang, luka kulit, pembengkakan hati, campak, bisul, mimisan, amandel, radang tenggorokan, bronkhitis, tekanan darah tinggi, wasir, keracunan, cacingan, sakit perut, ayan (epilepsi), luka bakar, kesuburan wanita, keputihan, anti bakteri, anti tumor (Mursito, 2004).

Manfaat tanaman pegagan juga mampu memperbaiki sistem daya ingat bagi orang-orang yang mengalami kemunduran fungsi otak dan daya ingat. Pegagan merupakan tumbuhan sejenis dengan *Ginkgo biloba*, bahkan lebih banyak khasiatnya. Suatu penelitian membuktikan bahwa pegagan mampu meningkatkan kemampuan mental, meningkatkan IQ, dan meningkatkan kemampuan saraf memori. dalam ilmu farmasi ia dikenal juga sebagai *Folia hydrocotyles*, yang dipercaya bisa meningkatkan ketahanan tubuh, mencuci darah, dan memperlancar keluarnya air seni (diuretik) (Suryo, 2010).

Pegagan memiliki khasiat obat karena mengandung beberapa senyawa kimia antara lain: alkaloid hidroksilina, centellose, oksiatikosida, mucilago, pektin, resin, gula pereduksi, protein, minyak atsiri, glikosida triterpenoid (asiatikosida, asam asiatat, asam madekasat), flavonoid, mineral, vellarine, tannin, vitamin B1 dan sedikit vitamin C. Selain itu dalam 100 g daun pegagan mengandung 34 kalori, 8,3 g air, 1,6 g protein, 0,6 g lemak, 6,9 g karbohidrat, 1,6 g abu, 170 mg kalsium, 30 mg fosfor, 3,1 g zat besi, 414 mg kalium, 6.580 mg betakaroten, 0,15 mg tiamin, 0,14 mg riboflavin, 1,2 mg niasin, 4 mg askorbat, dan 2,0 g serat (Duke, 1987).

Senyawa yang terdapat dalam pegagan yang memiliki kadar tinggi yaitu asiatikosida dan madekasosida. Senyawa asiatikosida yang terdapat dalam pegagan dapat digunakan untuk mencegah kerusakan membran sel hepatosit dan mencegah degradasi lemak karena terbakar, serta meningkatkan aktivitas enzim leusin aminopeptidase yang berfungsi pada regenerasi kulit, sehingga mengurangi kerusakan kulit akibat luka bakar (Tsurumi, 1973). Senyawa asiatikosida yang

terdapat di dalam tanaman pegagan mampu meningkatkan daya ingat, konsentrasi dan kewaspadaan. Hal ini dimungkinkan karena asiatikosida yang terkandung di dalamnya mampu membantu kelancaran sirkulasi oksigen dan nutrisi serta melindungi sel-sel otak dari kerusakan oksidatif oleh radikal bebas karena kandungan asam lemak yang sangat tinggi dan mudah teroksidasi (Bermawi *et al.* 2005). Sedangkan madekasosida yang ada dalam pegagan merupakan agen pelembap kulit yang merupakan bahan aktif kosmetik untuk digunakan dalam anti penuaan, mengobati kulit sensitif, kulit yang sangat kering dan bisa diaplikasikan pada kulit dewasa. Madekasosida mengaktifkan ekspresi kolagen, memberikan normalisasi hiperproliferasi keratinosit dan juga sebagai anti inflamasi (Bonte,1995)

2.2 Kultur Jaringan Tanaman

2.2.1 Pengertian Kultur Jaringan

Pada tahun 1901 Morgan mengemukakan bahwa setiap sel mempunyai kemampuan untuk berkembang menjadi suatu jasad hidup yang lengkap melalui proses regenerasi. Kemampuan ini oleh Morgan disebut sebagai totipotensi. Konsep totipotensi tersebut mempunyai makna sangat penting dalam kultur jaringan. Istilah kultur jaringan mengacu pada teknik untuk menumbuhkan jasad multiseluler dalam medium padat maupun cair menggunakan jaringan yang diambil dari jasad tersebut. Teknik kultur jaringan tersebut dilakukan sebagai alternatif perbanyakan tanaman bukan dengan menggunakan media tanah, melainkan dalam medium buatan didalam tabung. Teknik ini sekarang sudah

berkembang luas sehingga bagian tanaman yang digunakan sebagai bahan awal perbanyakan tidak hanya berupa jaringan melainkan juga dalam bentuk sel sehingga juga dikenal dengan kultur sel. Oleh karena itu teknik secara umum disebut teknik kultur *in vitro* (Yuwono, 2006).

Kultur jaringan adalah teknik perbanyakan tanaman dengan cara memperbanyak jaringan mikro tanaman yang ditumbuhkan secara *in vitro* menjadi tanaman yang sempurna dalam jumlah yang tidak terbatas. Menurut Azriati, (2010), kultur *in vitro* adalah suatu metode untuk mengisolasi potongan jaringan tanaman dari kondisi alami pada media nutrisi dalam kondisi aseptik, dimana potongan yang diambil mampu mengadakan perbesaran, perpanjangan, pembelahan sel dan membentuk suatu massa sel yang belum terdeferinsiasi yang disebut kalus serta membentuk *shootles* (tunas), *rootlet* (akar), atau *planlet* (tanaman lengkap).

Firman Allah dalam surat Al-Insyqaaq ayat 19 adalah sebagai berikut :

لَتَرْكَبُنَّ طَبَقًا عَنْ طَبَقٍ ﴿١٩﴾

Artinya: “Sesungguhnya kamu melalui tingkat demi tingkat (dalam kehidupan)” (QS. Al-Insyqaaq 84:19)

Makna ayat diatas menurut Shihab (2002), semua mengalami perubahan sebagaimana manusia juga mengalami perubahan-perubahan dalam perjalanan hidupnya, karena *dia pasti mengalami tingkat demi tingkat*. Begitu juga dengan tumbuhan akan mengalami perkembangan dengan melalui beberapa tahapan.

Untuk mengembangkan tanaman secara *in vitro* sampai menjadi planlet dan akhirnya menjadi tanaman lengkap yang siap dipindah ke medium tanah, maka terdapat beberapa tahapan utama yang harus dilakukan, yaitu (Yuwono,2006) :

1. Pemilihan sumber tanaman yang akan digunakan sebagai bahan awal (eksplan)
2. Penanaman pada medium yang sesuai sampai terjadi perbanyakan (misalnya dalam bentuk kalus)
3. Pembentukan tunas dan akar sampai terbentuk planlet
4. Aklimatisasi, yaitu proses adaptasi pada lingkungan diluar sistem *in vitro*
5. Penanaman pada medium tanah

2.2.2. Faktor – Faktor Yang Mempengaruhi Kultur Jaringan Tumbuhan

Ada beberapa faktor yang berpengaruh dalam teknik kultur jaringan *in vitro*. Faktor-faktor tersebut antara lain (Gunawan, 1995) :

a. Media Kultur

Media merupakan faktor penentu dalam perbanyakan dengan kultur jaringan. Komposisi media yang digunakan tergantung dengan jenis tanaman yang akan diperbanyak. Media yang digunakan biasanya terdiri dari garam mineral, vitamin, dan hormon. Selain itu, diperlukan juga bahan tambahan seperti agar dan gula. Zat pengatur tumbuh (hormon) yang ditambahkan juga bervariasi, baik jenisnya maupun jumlahnya, tergantung dengan tujuan dari kultur jaringan yang dilakukan. Media yang sudah jadi ditempatkan pada tabung reaksi atau botol-botol kaca. Media yang digunakan juga harus

disterilkan dengan autoklaf. Maka rantai pertama dalam pelaksanaan kultur *in vitro* adalah persiapan media tanam. Dalam media diberikan berbagai garam mineral, air, gula, asam amino, zat pengatur tumbuh, pematat media untuk pertumbuhan dan perkembangan, serta kadang-kadang arang aktif untuk mengurangi efek penghambatan dari persenyawaan polifenol (warna coklat-hitam) yang keluar akibat pelukaan jaringan pada jenis-jenis tanaman tertentu, gula, asam amino, dan vitamin ditambahkan karena eksplan yang ditanam tidak lagi sepenuhnya hidup secara autotrof (hidup dari bahan-bahan anorganik dari alam). Dalam kultur *in vitro*, segmen tanaman hidup secara heterotrof (mendapat suplai bahan organik). Media kultur adalah media steril yang digunakan untuk menumbuhkan sumber bahan tanaman menjadi bibit. Media kultur terdiri dari garam anorganik, sumber energi (karbon), vitamin, dan zat pengatur tumbuh. Selain itu, dapat pula ditambahkan komponen lain seperti senyawa organik dan senyawa kompleks lainnya.

b. Bahan Tanaman (eksplan)

Eksplan merupakan bagian tanaman yang akan dikulturkan. Eksplan dapat berasal dari meristem, tunas, batang, anter, daun, embrio, hipokotil, biji, rhizome, dan jug akar. Ukuran eksplan yang digunakan bervariasi dari ukuran $\pm 0,1$ mm sampai 5 cm. Jenis eksplan akan mempengaruhi morfogenesis suatu kultur *in vitro* (Wattimena *et.al.*, 1992)

c. Faktor Lingkungan

Faktor-faktor lingkungan yang berpengaruh terhadap perkembangan kultur jaringan antara lain pH, kelembaban, cahaya dan temperatur. Faktor

lingkungan tersebut berpengaruh terhadap proses pertumbuhan dan diferensiasi sel. Sel-sel tanaman yang dikembangkan dengan teknik kultur jaringan mempunyai toleransi pH yang relatif sempit, yaitu 5,0 - 6,0. Bila eksplan mulai tumbuh, pH dalam kultur umumnya akan naik apabila nutrisi habis terpakai. Senyawa fosfat dalam media kultur mempunyai peran yang penting dalam menstabilkan pH. Pengukuran pH dapat dilakukan dengan menggunakan pH meter atau dengan kertas pH, bila pH medium masih terlalu asam dapat ditambahkan KOH, sedangkan apabila pH-nya terlalu basa maka dapat ditambahkan dengan HCL. Beberapa kondisi lingkungan seperti cahaya, suhu, dan fase-fase gas mempengaruhi pertumbuhan tanaman dalam kultur *in vitro*, karena faktor-faktor tersebut diduga mempunyai pengaruh yang penting pada bagian tanaman dalam mikropropagasi. Mikropropagasi adalah penggunaan eksplan atau organ tumbuhan untuk tujuan percambahan atau pengklonan anak benih menggunakan teknik kultur jaringan (Gunawan,1995).

2.2.3 Zat Pengatur Tumbuh

Hormon tumbuhan atau fitohormon, adalah senyawa organik yang disintesis di salah satu bagian tumbuhan dan dipindahkan ke bagian lain, dan pada konsentrasi yang sangat rendah mampu menimbulkan suatu respon fisiologis. Hormon tumbuhan dihasilkan sendiri oleh individu yang bersangkutan ("endogen"). Pemberian hormon dari luar sistem individu dapat pula dilakukan ("eksogen"). Pemberian secara eksogen dapat juga melibatkan bahan kimia (sintetik) yang menimbulkan rangsang yang serupa dengan fitohormon alami.

Oleh karena itu, untuk mengakomodasi perbedaan dari hormon hewan, dipakai pula istilah zat pengatur tumbuh tumbuhan (bahasa Inggris: *plant growth regulator/substances*) bagi hormon tumbuhan (Salisbury, 1995).

Zat pengatur Tumbuh (ZPT) pada tanaman adalah senyawa organik yang bukan termasuk unsur hara (nutrisi), yang dalam jumlah sedikit dapat mendukung, menghambat dan dapat merubah proses fisiologis tumbuhan. Zat pengatur tumbuh pada tanaman terdiri dari lima kelompok yaitu auksin, giberelin, sitokinin, etilen 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, 1985).

2.2.3.1 2, 4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D)

2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D) merupakan jenis auksin sintetis yang sering digunakan dalam kultur jaringan. 2,4-D merupakan auksin kuat yang sering digunakan untuk menginduksi terbentuknya kalus dari berbagai jaringan tanaman. 2,4-D menyebabkan pembelahan sel (Abidin, 1985)

Kombinasi zat pengatur tumbuh yang ditambahkan ke dalam medium merupakan faktor utama penentu keberhasilan kultur *in vitro* kalus. Zat pengatur tumbuh (ZPT) yang sering digunakan untuk menginduksi pembentukan kalus adalah auksin. Di antara golongan auksin yang umum digunakan pada media kultur jaringan adalah 2,4-D dan IAA. Dibanding dengan golongan auksin IAA, 2,4-D memiliki sifat lebih stabil karena tidak mudah terurai oleh enzim-enzim yang dikeluarkan oleh sel tanaman ataupun oleh pemanasan pada proses sterilisasi.

Pemberian sitokinin dalam kultur kalus berperan penting dalam memicu pembelahan dan pemanjangan sel sehingga dapat mempercepat perkembangan dan pertumbuhan kalus (Indah, 2013).

2.2.3.2 Air Kelapa

Aplikasi sitokinin dalam perbanyakan tanaman *in vitro* dapat berasal dari bahan kimia sintetik maupun bahan alami seperti air kelapa. Berbagai bahan alami dapat digunakan sebagai substitusi ZPT di antaranya air kelapa. Air kelapa merupakan bahan alami mempengaruhi pembelahan sel dan mendorong pembentukan organ. Air kelapa merupakan endosperm atau cadangan makanan cair sumber energi. Air kelapa yang baik untuk kultur jaringan tumbuhan adalah air kelapa muda yang daging buahnya berwarna putih, belum keras tapi masih diambil menggunakan sendok (Surachman, 2011).

Air kelapa mendorong pembentukan akar pada media MS tanpa ZPT atau yang dikombinasi dengan IAA. Air kelapa juga mendorong pembentukan kalus. Air kelapa berperan meningkatkan efisiensi penggunaan hara N terutama yang dikombinasi dengan BAP dan IAA, dan hara P yang dikombinasi dengan IAA. Air kelapa berperan meningkatkan kandungan klorofil jaringan, menurunkan kandungan sukrosa dan pati jaringan dari kultur yang pertumbuhannya lebih serta meningkatkan tekanan osmotik dan kapasitas buffer media (Mandang, 1993).

Berdasarkan hasil analisis hormon yang dilakukan oleh Savitri (2005) ternyata dalam air kelapa muda terdapat Giberelin (0,460 ppm GA₃, 0,255 ppm GA₅, 0,053 ppm GA₇), Sitokinin (0,441 ppm Kinetin, 0,247 ppm Zeatin) dan

Auksin (0,237 ppm IAA). Selain kandungan beberapa hormon, air kelapa muda juga mengandung vitamin yang cukup beragam, diantaranya thiamin dan piridoksin. Kandungan vitamin dalam air kelapa dapat dijadikan substitusi vitamin sintetik yang terkandung pada media MS. Kandungan hara makro seperti N, P, dan K, serta beberapa jenis unsur mikro dalam air kelapa muda juga berpeluang dikembangkan lebih lanjut sebagai upaya substitusi unsur hara mikro dan makro serta sumber karbon, yakni sukrosa (Kristina, 2012). Komposisi vitamin, mineral dan sukrosa dalam air kelapa muda dan tua (Tabel.2.1)

Tabel 2.1. Komposisi vitamin, mineral, dan sukrosa dalam air kelapa muda dan tua (Kristina, 2012).

Komposisi	Air Kelapa Muda (mg/100mL)	Air Kelapa Tua (mg/100mL)
Vitamin		
Vitamin C	8.59	4.50
Ribofalvin	0.26	0.25
Vitamin B5	0.60	0.62
Inositol	20.52	21.50
Piridoksin	0.03	-
Thiamin	0.02	-
Mineral		
N	43.00	-
P	13.17	12.50
K	14.11	15.37
Mg	9.11	7.52
Fe	0.25	0.32
Na	21.07	20.55
Mn	Tidak terdeteksi	Tidak terdeteksi
Zn	1.05	3.18
Ca	24.67	26.50
Sukrosa	4.89	3.45

2.3. Kultur Kalus

Tanaman dapat diperbanyak secara vegetatif menggunakan teknik kultur *in vitro* dengan teknik kultur kalus atau kultur sel. Jika suatu eksplan ditanam pada medium padat atau dalam medium cair yang sesuai, dalam waktu 2 – 4 minggu, tergantung spesiesnya, akan terbentuk massa kalus yaitu suatu massa yang memiliki bentuk tidak beraturan, tersusun atas sel-sel parenkim berdinding sel tipis yang berkembang dari hasil proliferasi sel-sel jaringan induk (Yuwono,2006)

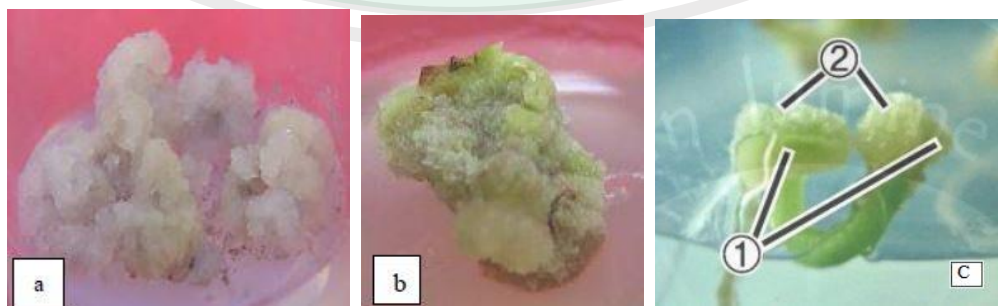
Kultur kalus dapat dikembangkan dengan menggunakan eksplan yang berasal dari berbagai sumber, misalnya tunas muda, daun, ujung akar, dan bunga. Kalus dihasilkan dari lapisan luar sel-sel korteks pada eksplan melalui pembelahan sel berulang – ulang. Kultur kalus tumbuh berkembang lebih lambat dibandingkan kultur yang berasal dari suspensi sel. Kalus terbentuk melalui tiga tahapan yaitu induksi, pembelahan dan diferensiasi. Pembentukan kalus ditentukan sumber eksplan, komposisi nutrisi pada medium, dan faktor lingkungan. Eksplan yang berasal dari jaringan meristem berkembang lebih cepat dibanding jaringan dari sel-sel berdinding tipis dan mengandung lignin. Untuk memelihara kalus, maka perlu dilakukan subkultur secara berkala, misalnya setiap 30 hari (Andaryani,2010).

Kultur kalus bermanfaat untuk mempelajari beberapa aspek dalam metabolisme tumbuhan dan diferensiasinya, misalnya mempelajari aspek nutrisi tanaman, diferensiasi dan morfogenesis sel dan organ tanaman, variasi somaklonal, transformasi genetik menggunakan teknik biolistik, produksi metabolit sekunder dan regulasinya (Yuwono,2006).

2.3.1 Tekstur Kalus

Tekstur kalus merupakan salah satu penanda yang dipergunakan untuk menilai kualitas suatu kalus. Kalus yang baik diasumsikan memiliki tekstur remah karena memudahkan dalam pemisahan menjadi sel-sel tunggal pada kultur suspensi, disamping itu akan meningkatkan aerasi oksigen antar sel. Tekstur kalus dapat dibedakan menjadi tiga macam yaitu, kompak (*non friable*), remah (*friable*) dan intermediet (Perpaduan antara kompak dan remah) (Andaryani, 2010).

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

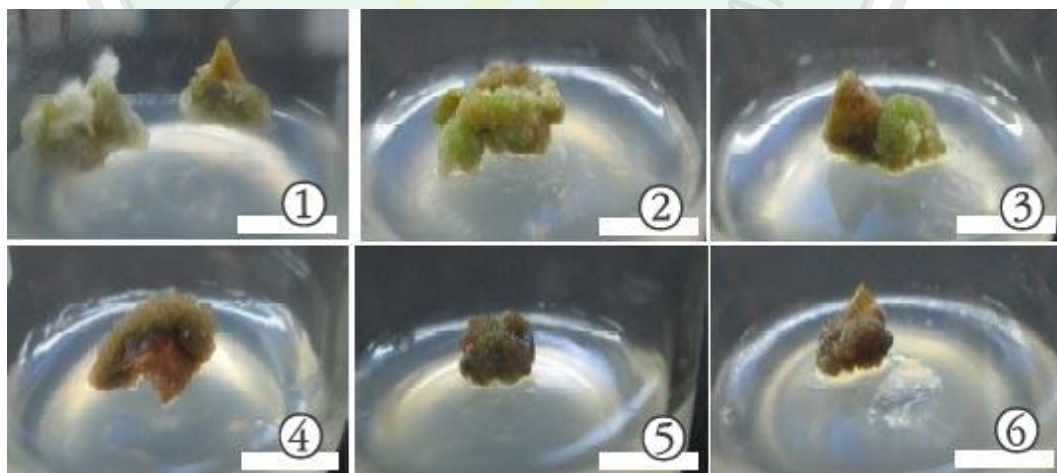


Gambar 2.2 Tekstur kalus (a) tekstur kalus remah, (b) tekstur kalus kompak, (c) tekstur kalus intermediet (1=remah, 2=kompak) (Yelnitis,2012)

2.3.2. Warna Kalus

Indikator pertumbuhan eksplan pada budidaya *in vitro* berupa warna kalus menggambarkan penampilan visual kalus sehingga dapat diketahui suatu kalus tersebut masih memiliki sel-sel yang aktif membelah atau telah mati. Kualitas kalus yang baik memiliki warna hijau. Warna hijau pada kalus adalah akibat efek konsentrasi sitokinin yang tinggi yang mempengaruhi pembentukan klorofil (Riyadi dan Tirtoboma, 2004). Warna kalus yang hijau disebabkan oleh peningkatan konsentrasi sitokinin yang tinggi. Sitokinin yang ditambahkan dalam media mampu menghambat perombakan butir-butir klorofil karena sitokinin mampu mengaktifkan proses metabolisme dalam sintesis protein (Wardani, 2004).

Kondisi warna kalus yang bervariasi disebabkan oleh adanya pigmentasi, cahaya, dan bagian tanaman yang dijadikan sebagai sumber eksplan. Eksplan yang cenderung berwarna kecoklatan disebabkan oleh kondisi eksplan yang secara mempunyai kandungan fenol tinggi (Hendayono dan Wijayani, 1994).



Gambar 2.3 Contoh visualisasi warna kalus eksplan kotiledon tanaman *Helianthus annuus* L. 1. Hijau Bening, 2. Hijau Kekuningan 3. Hijau kecoklatan, 4. Coklat, 5. Coklat⁺ 6. Coklat⁺⁺ (Lutviana, 2012)

2.3.3 Subkultur Kalus

Sel-sel yang membelah secara terus menerus dan pembelahannya tidak terkendali maka akan membentuk massa sel yang tidak terorganisasi, yang disebut kalus. Pembelahan sel yang tidak terkendali itu disebabkan oleh sel-sel tumbuhan, yang secara normal bersifat autotrof, dikondisikan menjadi heterotrof dengan memberikan nutrisi yang kompleks di dalam media kulturnya. Sel-sel kalus ini berbeda dengan sel-sel eksplan, yang mana sel-sel itu tidak terdeferensiasi. Laju pertumbuhan sel, jaringan, dan organ tanaman di dalam kultur akan menurun setelah periode waktu tertentu, yang terlihat dengan terjadinya kematian sel atau nekrosis pada eksplan, yang disebabkan menyusutnya kadar nutrisi pada media dan senyawa racun yang terbentuk dan dilepaskan oleh eksplan disekitar media. Bila gejala demikian mulai muncul maka harus segera dilakukan subkultur yaitu pemindahan sel, jaringan atau organ ke dalam media baru. Hal ini dilakukan agar laju pertumbuhan sel tetap konstan dan untuk diferensiasi kalus. Media yang digunakan untuk subkultur dapat sama atau berbeda dengan media semula (Yuliarti, 2010).

Kalus dapat disubkultur dengan cara mengambil sebagian kalus dan memindahkannya ke medium yang baru. Dengan sistem induksi yang tepat kalus dapat berkembang menjadi tanaman yang berkembang atau utuh (planlet) (Yuwono, 2006).

2.3.4 Teknik Kultur Kalus Untuk Memproduksi Metabolit Sekunder

Kalus merupakan masa sel-sel parenkim yang tidak berdeferinsiasi atau belum memiliki bentuk, terbentuk disekitar luka atau akibat kerja hormon auksin dan sitokinin (Pierik, 1987). Pertumbuhan kalus dapat digambarkan dalam bentuk kurva sigmoid, biasanya terdiri dari lima fase yaitu (1) fase lag, sel siap 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 dalam medium. Pada fase ini harus dilakukan subkultur agar kalus tetap hidup (Darwati, 2007).

Faktor-faktor yang mempengaruhi keberhasilan teknik kultur jaringan dalam rangka produksi senyawa metabolit sekunder adalah sebagai berikut (Ernawati, 1992) :

1. Ekspresi sintesis senyawa metabolit sekunder
2. Asal eksplan, meliputi karakteristik genetik dan fisiologi tanaman.
3. Kondisi-kondisi yang mempengaruhi kultur *in vitro*, seperti pemberian zat pengatur tumbuh, sumber karbon, hara makro dan mikro, pH media serta faktor lingkungan meliputi cahaya dan suhu ruang kultur.

Faktor lain yang mempengaruhi keberhasilan kultur jaringan tanaman untuk produksi metabolit sekunder adalah pemberian prekursor dan penggunaan elisitor yang dapat meningkatkan kultur sel tanaman untuk memproduksi metabolit sekunder (Bhojwani dan Razdan, 1996). Pada tanaman obat-obatan, kultur kalus merupakan langkah awal dalam menentukan produksi bahan metabolit sekunder (Mahadi, 2008). Selanjutnya Sujata *et al.* (2011) menambahkan bahwa kultur jaringan tanaman obat-obatan lebih cenderung melalui proses pembentukan organogenesis secara tidak langsung. Ini berkaitan dengan tujuan produksi bahan metabolit sekunder, karena selalu melibatkan penghasilan agregat-agregat sel yang dikultur dalam kultur suspensi sebelum ke sistem bioreaktor, sehingga kebanyakan sasaran awal adalah untuk mendapatkan kalus (Maharjan *et al.*, 2010).

Menurut Indah (2013), sebagian besar komponen kimia yang berasal dari tanaman yang digunakan sebagai obat atau bahan obat merupakan metabolit sekunder yang dapat dihasilkan dengan teknik kultur jaringan. Senyawa metabolit sekunder melalui kultur jaringan dapat diisolasi dari kalus atau sel. Ada 4 keuntungan dalam pemanfaatan teknik kultur jaringan untuk produksi senyawa metabolit sekunder yaitu menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang lebih konsisten dan dalam waktu lebih singkat, faktor lingkungan dapat diatur dan dikendalikan, mutu dari senyawa metabolit sekunder yang diproduksi lebih baik, dan dapat manipulasi pemakaian zat pengatur tumbuh.

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. Metabolisme pada makhluk hidup dapat dibagi menjadi metabolisme primer dan sekunder. Metabolisme primer menghasilkan metabolit primer sedangkan metabolisme sekunder menghasilkan metabolit sekunder (Sholihah, 2011).

Polisakarida, protein, lemak dan asam nukleat merupakan penyusun utama dari makhluk hidup karena itu disebut metabolit primer. Adapun proses metabolisme primer merupakan keseluruhan proses sintesis dan perombakan zat-zat ini yang dilakukan oleh organisme, untuk kelangsungan hidupnya. Metabolit primer dari semua organisme sama meskipun sangat berbeda genetiknya (Istiani, 2010).

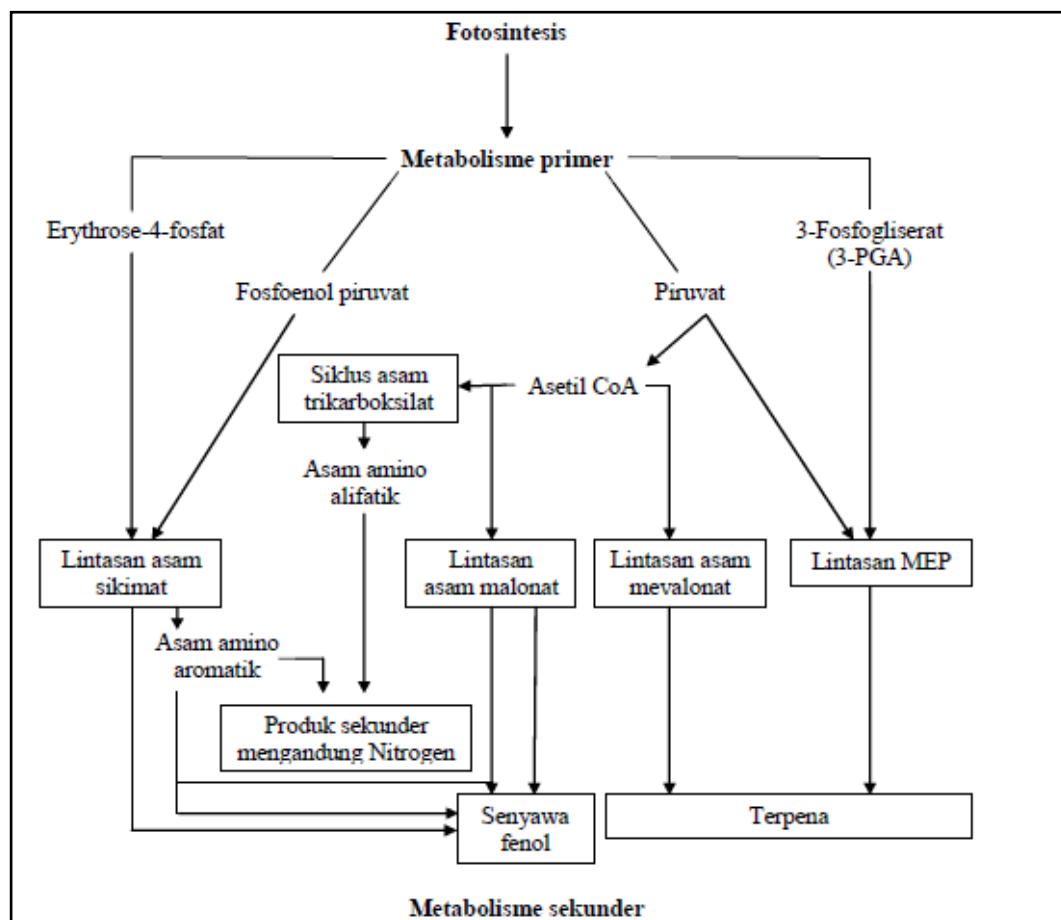
Beberapa contoh proses metabolisme primer adalah (Dewick, 1999):

- a. Degradasi senyawa karbohidrat dan gula, biasanya terjadi melalui jalur glikolisis dan siklus krebs atau asam sitrat atau trikarboksilat yang menghasilkan energi melalui reaksi oksidasi,
- b. Degradasi lemak melalui reaksi β -oksidasi yang juga menghasilkan energi,
- c. Optimasi pembentukan energi melalui proses oksidasi fosforilasi pada organisme aerobik, dan lain-lain.

Metabolit dan metabolisme primer dibutuhkan untuk menunjang terjadinya pertumbuhan pada setiap organisme, oleh karena itu bersifat growth link (Sudibyo, 2002). Metabolisme primer pada tumbuhan 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 herbivora dan hama), ketahanan terhadap penyakit atau bahkan tidak memberikan efek sama sekali bagi tumbuhan tersebut (Sholihah,2011).

Metabolit sekunder dibentuk dari metabolit primer antara lain asam amino, asetil koenzim A, asam mevalonat, dan intermediate dari lintasan shikimat (Herbert 1995). Pembentukan metabolit sekunder dipengaruhi oleh banyak faktor antara lain: suhu, pH, aktivitas air dan intensitas cahaya. Lahan yang relatif kering, pH dan kelembaban tanah adalah merupakan parameter yang relevan untuk terbentuknya metabolit sekunder (Sutardi,2008). Metabolit dibentuk melalui lintasan (*pathway*) yang khusus dari metabolit primer (Gambar 2.4)



Gambar 2.4 Lintasan biosintesis metabolit di dalam tanaman (Taiz & Zeiger 2002)

2.5 Metabolit Sekunder

Metabolit sekunder atau dikatakan sebagai bahan alami merupakan senyawa yang dihasilkan oleh tanaman dalam jumlah relatif besar, namun tidak memiliki fungsi langsung terhadap pertumbuhan dan perkembangan suatu tanaman (Taiz and Zeiger 2002). Metabolit sekunder sangat diperlukan bagi tumbuhan beberapa diantaranya bermanfaat sebagai mekanisme pertahanan dalam melawan serangan bakteri, virus, dan jamur sehingga dapat dianalogikan seperti sistem kekebalan tubuh (Vickery dan Vickery 1981).

Metabolit sekunder merupakan senyawa-senyawa yang terdapat pada spesies tertentu dan sangat khas untuk setiap spesies. Metabolit sekunder berperan untuk kelangsungan hidup suatu spesies dalam perjuangan untuk menghadapi spesies-spesies lain. Penyebarannya lebih terbatas, terutama pada tumbuhan dan mikroorganisme serta memiliki spesifikasi untuk setiap spesiesnya (Manitto, 1981). Senyawa metabolit sekunder terbentuk pada saat tidak ada pertumbuhan sel yang dikarenakan keterbatasan nutrisi zat gizi dalam medium sehingga merangsang dihasilkannya enzim-enzim yang berperan dalam pembentukan metabolit sekunder dengan memanfaatkan metabolit primer untuk mempertahankan kelangsungan hidupnya. Sebagian besar metabolit sekunder dapat berubah dengan laju tertentu dan dapat mengalami metabolisme sempurna menjadi karbondioksida sehingga kadar metabolit sekunder dalam organ makhluk hidup belum diketahui apakah akan bertambah, tetap, berkurang ataukah acak seiring dengan perkembangan hidupnya (Istiani, 2010)

Metabolit sekunder merupakan senyawa yang disintesis tanaman dan digolongkan menjadi lima yaitu glikosida, terpenoid, fenol, flavonoid, dan alkaloid. Senyawa-senyawa tersebut bermanfaat bagi tanaman itu sendiri maupun bagi serangga, hewan dan manusia. 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. Misalnya, nikotin dibentuk dari ornitin dan asam nikotinat. Diantaranya adalah kelompok alkaloid benzyl 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 turunan dari asam mevalonat atau prekursor lain yang serupa dan memiliki keragaman struktur yang sangat banyak (Vickery and Vickery, 1981)

Metabolit sekunder selanjutnya yaitu steroid. Steroid adalah molekul kompleks yang larut di dalam lemak dengan empat cincin yang saling bergabung. Steroid yang paling banyak adalah sterol yang merupakan steroid alkohol. Kolesterol merupakan sterol utama pada jaringan hewan. Kolesterol dan senyawa turunan esternya, dengan lemaknya yang berantai panjang adalah komponen penting dari plasma lipoprotein dan dari membran sel sebelah luar. Membran sel tumbuhan mengandung jenis sterol lain terutama stigmasterol yang berbeda dari kolesterol hanya dalam ikatan ganda di antara karbon 22 dan 23 (Lehninger 1982).

Macam metabolit sekunder salah satunya yaitu fenol. Fenol adalah suatu senyawa aromatik, yang struktur kimianya diturunkan dari benzena jika satu atau lebih atom hidrogen yang terikat pada inti benzena diganti dengan satu atau lebih gugus hidroksil (Sumardjo, 2005). Senyawa flavonoida adalah kelompok senyawa fenol terbesar yang ditemukan di alam. Senyawa ini merupakan zat warna merah, ungu, biru dan kuning yang ditemukan dalam tumbuh-tumbuhan. Sejumlah tanaman obat yang mengandung flavonoid telah dilaporkan memiliki aktivitas antioksidan, antibakteri, antivirus, antiradang, antialergi dan antikanker. Efek antioksidan senyawa ini disebabkan oleh penangkapan radikal bebas melalui donor atom hydrogen dari gugus fungsi hidroksil flavonoid (Mardisadora, 2010).

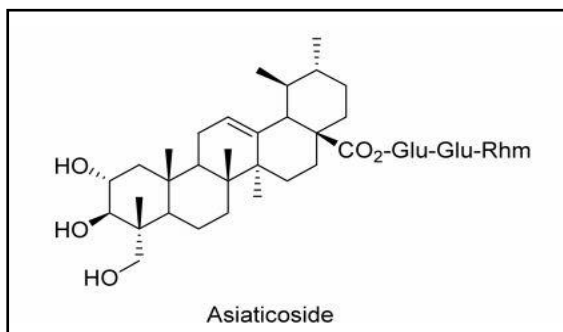
Metabolit sekunder ada juga yang disebut dengan fitoaleksin. Fitoaleksin didefinisikan sebagai senyawa kimia yang mempunyai berat molekul rendah yang

memiliki sifat antimikroba atau antiparasit. Senyawa ini diproduksi oleh tanaman pada waktu mengalami infeksi atau cekaman (stress) lingkungan (Simanjutak, 2002). Fitoaleksin merupakan senyawa kimia yang berasal dari derivat flavonoid dan isoflavon, turunan sederhana dari fenilpropanoid, dan derivat dari sesquiterpens. Fitoaleksin berasal dari biosintesis metabolit primer 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 deoksiselulosa difosfat. Biosintesis fitoaleksin menggunakan perkusor yang berasal dari jalur metabolit sekunder (Hammerschmidt, 1999).

2.6 Senyawa asiatikosida dan Senyawa madekasosida

2.6.1 Senyawa asiatikosida

Asiatikosida adalah senyawa golongan glikosida triterpenoid sebagai senyawa identitas pegagan. Asiatikosida mengandung glikon yang terdiri dari satu molekul rhamnosa dan dua molekul glukosa. Aglikon triterpen dari asiatikosida ini disebut asam asiatika yang memiliki gugus alkohol primer, glikol dan satu buah karboksilat tersesterifikasi dengan gugus gula (Pramono, 1992). Menurut Vickery dan Vickery (1981), asiatikosida merupakan golongan triterpenoid turunan dari α -amyrin yang efektif untuk penyembuhan lepra. Adapun rumus kimia asiatikosida adalah $C_{48}H_{78}O_{19}$ (Gambar 2.5)



Gambar 2.5 Struktur kimia asiatikosida (Jeong, 2007).

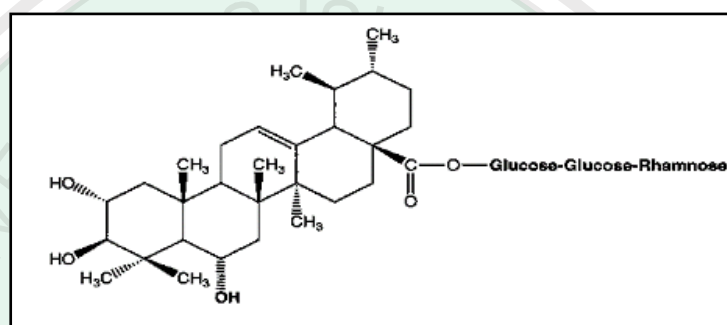
Senyawa glikosida triterpenoida yang disebut asiatikosida berperan dalam berbagai aktivitas penyembuhan penyakit. Kandungan asiatikosida membuat pegagan berfungsi sebagai antiinflamasi sehingga dapat diolah menjadi bahan baku salep untuk mengobati luka (Lasmadiwati *et al.* 2005).

2.6.1 Senyawa Madekasosida

Madekasosida merupakan triterpen utama pada herba pegagan, yang struktur kimianya hanya memiliki perbedaan satu gugus hidroksi saja dengan asiatikosida. Madekasosida merupakan bahan aktif kosmetik yang digunakan dalam anti penuaan, kulit sensitif, kulit yang sangat kering dan digunakan untuk aplikasi kulit dewasa. Madekasosida larut dalam air, bubuk Kristal dan hampir tidak berbau (Bonte,1995). Struktur kimia madekasosida dapat dilihat pada gambar 2.6

Penelitian dengan senyawa madekasosida telah dilakukan. Adanya madekasosida pada dosis tinggi (12 dan 24 mg/kgBB) menurunkan kadar nitrit oksida (NO) dan malondialdehid (MDA) pada jaringan kulit yang terbakar, sementara kadar reduksi glutathione (GSH) dan hidrosiprolin meningkat pada

jaringan yang sama. Berdasarkan pengujian secara *in vivo* madekasosida memperlihatkan efek angiogenesis pada kulit, hal ini berkaitan dengan uji *in vitro* yang telah dilakukan. Data ini menunjukkan efek penyembuhan madekasosida terhadap luka bakar, dan mekanisme aktivitasnya diperkirakan melalui beberapa mekanisme termasuk aktivitas antioksidan, sintesis kolagen dan angiogenesis (Liu, 2008).



Gambar 2.6 Struktur kimia madekasosida (Hashim, 2011).

2.6.3 Biosintesis Senyawa Asiatikosida dan Madekasosida

Biosintesis metabolit sekunder pada sebagian besar tanaman terjadi pada daun, yaitu di plastida, retikulum endoplasma, sitosol dan kloroplas. Kandungan senyawa metabolit sekunder asiatikosida pada pegagan banyak terdapat pada bagian daun tanaman (82.6%), tangkai daun (15.9%), dan pada bagian akar (1.5%) (Kim *et al.* 2004).

Mekanisme dari tahap-tahap reaksi biosintesis terpenoid adalah asam asetat setelah diaktifkan oleh koenzim A melakukan kondensasi jenis Claisen menghasilkan asam asetoasetat. Senyawa yang dihasilkan ini dengan asetil koenzim A melakukan kondensasi jenis aldol menghasilkan rantai karbon bercabang sebagaimana ditemukan pada asam mevalonat. Reaksi-reaksi berikutnya adalah fosforilasi, eliminasi asam fosfat dan dekarboksilasi

menghasilkan Isopentil pirofosfat (IPP) yang selanjutnya berisomerisasi menjadi Dimetil Alil Pirofosfat (DMAPP) oleh enzim isomerase. IPP sebagai unit isopren aktif bergabung secara kepala ke ekor dengan DMAPP dan penggabungan ini merupakan langkah pertama dari polimerisasi isopren untuk menghasilkan terpenoid. Penggabungan ini terjadi karena serangan elektron dari ikatan rangkap IPP terhadap atom karbon dari DMAPP yang kekurangan elektron diikuti oleh penyingkiran ion pirofosfat yang menghasilkan Geranil Pirofosfat (GPP) yaitu senyawa monoterpenoid. Penggabungan selanjutnya antara satu unit IPP dan GPP dengan mekanisme yang sama menghasilkan Farnesil Pirofosfat (FPP) yang merupakan senyawa seskuiterpenoid. Senyawa diterpenoid diturunkan dari Geranil-Geranil Pirofosfat (GGPP) yang berasal dari kondensasi antara satu unit IPP dan GPP dengan mekanisme sama (Lenny, 2006) (Gambar 2.7).

Selanjutnya yaitu terjadi sintase squalena (SQS) berubah menjadi squalena. Squalena epioksidase (SQE) mengoksidasi squalena menjadi 2,3 oksidosqualena siklase (OSC) mensiklisasi 2,3 –oksidossqualena melalui intermediet kation (misalnya kation dammarenil) menjadi satu atau lebih kerangka triterpen siklik. Enzim lain yang terlibat termasuk α/β -Amarin sintase (α/β -AS) yang juga dapat membentuk kation lupenil tapi ekspansi dan penyusunan ulang cincin lebih cepat diperlukan sebelum deprotonasi untuk α/β -Amarin, perkusor dari sapogenins, untuk menghasilkan produk (James, 2009). Biosintesis senyawa asiatikosida dan madekasosida dapat dilihat pada gambar 2.7.

Terpena dan turunan – turunannya yaitu terpenoid merupakan komponen terpenting zat-zat mudah menguap yang terdapat dalam bunga-bunga, daun–

daun, akar-akar dan kayu dari berbagai jenis tanaman (Sumardjo, 2008). Senyawa terpenoid merupakan salah satu produk alami yang sangat beragam yang disintesis dari tumbuhan karena berperan penting dalam berbagai fungsi fisiologis tumbuhan. Lebih dari 40.000 senyawa terpenoid berbeda yang telah di isolasi dari tumbuhan, hewan dan mikroba. Terpenoid memiliki ketertarikan sendiri karena banyak digunakan sebagai perasa, warna, bahan kimia pertanian dan obat-obatan (Lomeli, 2012).

Setiap tumbuhan pada umumnya memiliki satu jenis jalur biosintesa isoprene antara lain jalur asam mevalonat atau jalur DXP. Tetapi pada tumbuhan terdapat keunikan tumbuhan memiliki kedua jalur biosintesis isoprene tersebut pada setiap individunya perbedaannya hanyalah pada organ sel yang ditempati berlangsungnya proses reaksi tersebut (Agusta, 2006).

2.7 Mekanisme Kerja Elisitor

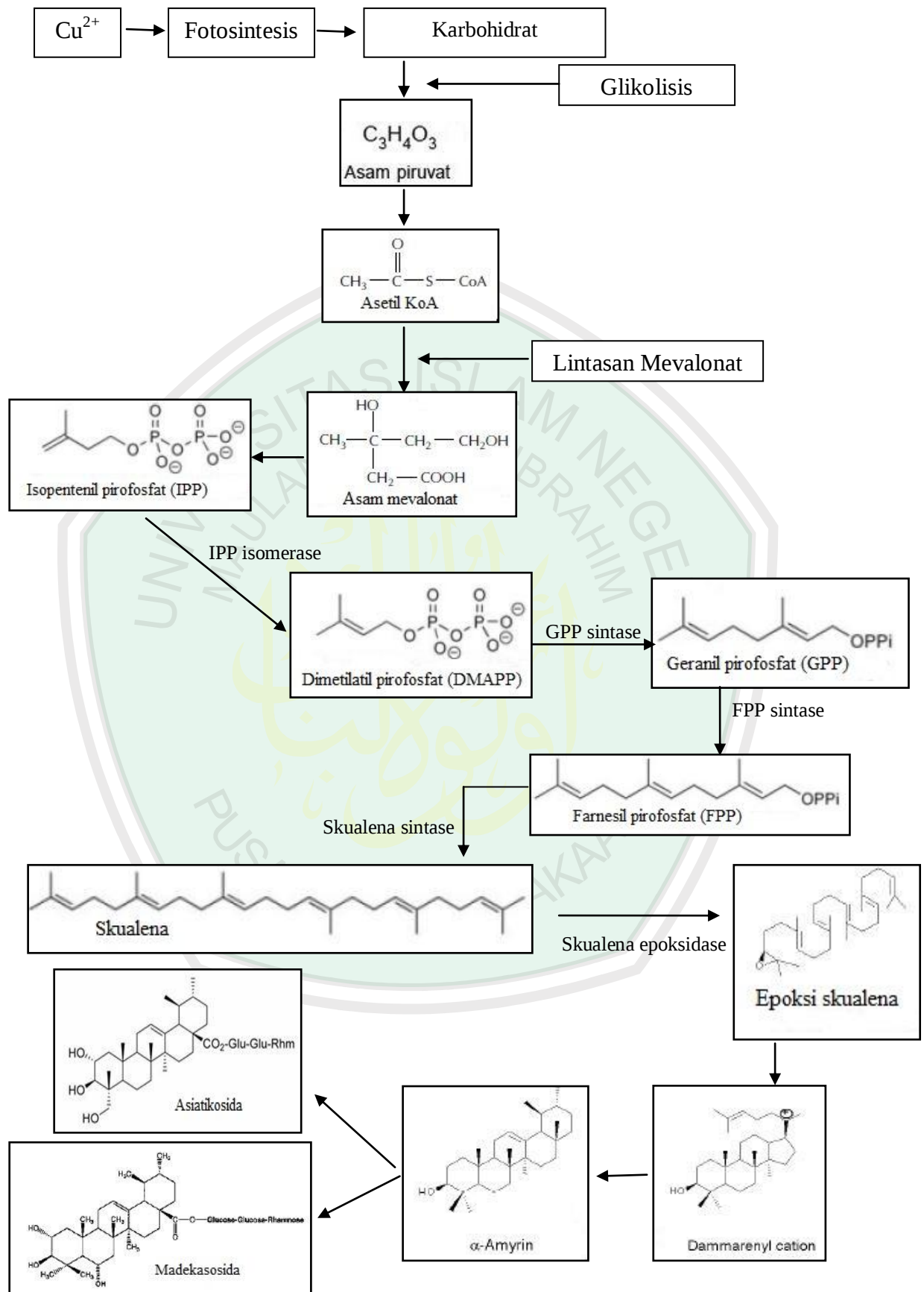
Elisitasi adalah teknik pemberian materi abiotik maupun biotik kedalam sel tumbuhan sehingga produksi metabolit sekunder tumbuhan dapat meningkat, sebagai respon tumbuhan dalam mempertahankan diri (Buitelaar, 1991). Elisitasi juga merupakan metode yang mengacu pada fenomena alam dalam mekanisme pertahanan inang terhadap patogennya. Interaksi antara patogen dengan tumbuhan inang yang menginduksi pembentukan fitoaleksin pada tumbuhan merupakan respon terhadap serangan mikroba patogen (Vanconsuelo & Boland 2007, Yoshikawa & Sugimoto 1993). Elisitor merupakan stimulus fisika, kimia maupun

biologi yang dapat menginduksi respon pertahanan pada tumbuhan (Oktafiana, 2010).

Elisitor mengaktifkan gen dalam tumbuhan yang mengkode enzim yang diperlukan untuk sintesis fitoaleksin. Elisitor selain menginduksi pembentukan fitoaleksin juga meningkatkan berbagai metabolit sekunder dan enzim lain. Pada kultur kalus dan kultur sel penambahan elisitor juga dapat menginduksi senyawa metabolit sekunder yang bukan fitoaleksin (Eilert *et al.* 1986). Asam jasmonik merupakan salah satu elisitor yang digunakan untuk meningkatkan metabolit sekunder. Penambahan asam jasmonik tersebut akan menginisiasi transkripsi gen-gen yang terlibat dalam mekanisme pertahanan pada tumbuhan sehingga akan menghasilkan metabolit sekunder (Habibah, 2009)

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

- a. Elisitor endogen, umumnya berasal dari bagian tumbuhan itu sendiri, seperti bagian dinding sel (poligogalakturonat) yang rusak. Rusaknya dinding sel ini disebabkan oleh suatu serangan pathogen. Dinding sel yang rusak dan terluka oleh karena efektivitas enzim hidrolisis dari serangan patogen.
- b. Elisitor 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, 1995)



Gambar 2.7 Biosintesis Senyawa Asiatikosida dan Madekasosida (James,2009)

Salah satu pengaruh yang ditimbulkan oleh elisitor adalah adanya depolarisasi membran sel tumbuhan yang berarti aktivasi saluran ion endogen oleh elisitor. Elisitor juga dapat membentuk pori sehingga memungkinkan ion menembus membran tanpa perlu terikat pada reseptor dan aktivasi saluran ion (Kluasener & Weiler 1999). Elisitasi dipengaruhi oleh spesifikasi elisitor, konsentrasi elisitor yang ditambahkan dan kondisi kultur (Vanconseulo & Boland 2007). Jumlah elisitor yang ditambahkan ke dalam kultur sel biasanya sangat kecil dan ditambahkan pada tahapan pertumbuhan kultur tertentu (Collin & Edward 1998).

Dua hipotesis mengenai pengenalan elisitor oleh sel-sel inang yaitu (Dmitrev,1996) :

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*. Reseptor yang terapat pada membrane sel berfungsi sebagai sistem sensor sinyal eksternal yang kemudian dihantarkan kedalam sistem *messenger intercellular* melalui adenilat siklase atau aktivasi fosfolipase. Proses ini akan memacu repon seluler pada sel terhadap rangsangan eksternal untuk kemudian sel mengubah ekspresi gennya. Selain itu menurut Silalahi (1999) menjelaskan bahwa akan terjadi peningkatan reaksi enzim – enzim dalam proses elisitasi yang diduga karena

pengikatan elisitor pada reseptor membrane plasma menyebabkan peningkatan Ca^{2+} interseluler yang bertindak sebagai *second messenger* untuk menginduksi transkripsi dan translasi enzim – enzim yang terlibat dalam jalur metabolit sekunder.

2.8 Peran Tembaga (Cu^{2+}) sebagai Elisitor Abiotik

Tembaga atau *copper* (Cu) merupakan logam berat yang dijumpai pada perairan alami dan merupakan unsur yang esensial bagi tumbuhan dan hewan. Pada tumbuhan, termasuk algae, tembaga berperan sebagai penyusun *plastocyanin* yang berfungsi dalam transpor elektron dalam proses fotosintesis (Effendi,2003). Tembaga merupakan mikronutrien penting untuk tanaman dan hewan menjadi komponen beberapa protein dan enzim yang terlibat dalam berbagai jalur metabolik (Ali,2006).

Secara garis besar proses elisitasi logam dapat di duga mempengaruhi dua jalur antara lain :

a. Stres oksidatif

Elisitasi abiotik menginduksi adanya stres oksidatif yang mengubah keseimbangan reaksi oksidatif seluler dan biokimia pada tanaman (Jing Wu, 2009). Cu^{2+} berperan dalam pengaturan respon pertahanan diri pada tanaman dengan cara menginduksi gen dan meningkatkan jalur metabolit sekunder sehingga adanya cekaman (stres oksidatif) akan berpengaruh terhadap jalur pembentukan metabolit sekunder (Muryanti,2005).

Secara garis besar penggunaan elisitor abiotik pada kultur jaringan tumbuhan dapat meningkatkan produksi metabolit sekunder. Adanya elisitor akan berpengaruh terhadap biosintesis metabolit sekunder dalam sel tanaman karena akan mengaktifkan gen yang mengkode enzim dalam jalur biosintesis metabolit sekunder (Jing Wu, 2009). Dilihat dari cekaman abiotik yang terjadi maka elisitasi ion Cu^{2+} akan mengaktifkan signal sistem pertahanan diri tumbuhan yang selanjutnya berfungsi sebagai penginduksi gen – gen yang berperan dalam produksi senyawa jenis terpenoid dalam jalur biosintesa deoksiselulosa difosfat. Gen – gen yang terlibat dalam proses ini salah satunya adalah enzim DXP reduktoisomerase yang di sandi oleh gen *dxr*.

b. Kofaktor enzimatis

Tembaga (Cu) merupakan kofaktor dari banyak enzim serta memiliki peranan penting dalam transpor elektron, reaksi redoks serta dalam berbagai jalur metabolisme (Marschener, 1995). Ion Cu^{2+} diperlukan karena berperan dalam proses enzimatis seperti *cytochrom oxidase*, *ascorbic acid oxidase* dan reaksi reduksi – oksidasi.

Peranan Cu^{2+} pada metabolisme terpenoid dapat memacu proses enzimatis. Awalnya ion logam ini akan dapat menembus membran sel. Kemudian elisitor ini akan 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.

Elisitor Cu^{2+} juga berperan sebagai kofaktor yang akan menempel pada sisi non protein pada enzim pemacu metabolisme metabolit sekunder jenis terpenoid dari jalur isoprene. Enzim yang dapat memacu pembentukan senyawa terpenoid antara lain adalah IPP isomerase, GPP sintase, FPP sintase yang dapat berlalui jalur asam mevalonat (Gambar 2.7).

