

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2. 1 Pegagan (*Centella asiatica*)

2.1.1 Deskripsi Pegagan

Tanaman pegagan (*Centella asiatica* L. Urban) merupakan tanaman liar yang banyak tumbuh di ladang, perkebunan, tepi jalan maupun di pekarangan. Pegagan ini berasal dari Asia tropik, menyukai tanah yang agak lembab, cukup sinar atau agak terlindung serta dapat ditemukan di daerah dataran rendah sampai dengan dataran dengan ketinggian 2.500 meter dpl (Hyene 1987; Dalimartha 2000; Januwati dan Yusron 2004).

Menurut BPOM RI (2010) pegagan diklasifikasikan sebagai berikut :

Divisi	Magnoliophyta
Kelas	Magnoliopsida
Subkelas	Rosidae
Bangsa	Apiales
Suku	Apiaceae
Marga	Centella
Jenis	<i>Centella asiatica</i> (L.) Urban

Nama daerah atau lokalnya adalah pegagan (Jakarta), antanan (Sunda), daun kaki kuda (Sumatra), tikusan (Madura), taiduh (Bali), kori-kori (Halmahera), gagan-gagan atau panigowang (Jawa), pegaga (Aceh), pegago (Minaokabau), dogauke atau

sandanan (Irian), gogauke (Papua), kalotidi manora (Maluku), bebile (Lombok) (Departemen Kesehatan Republik Indonesia 1989, Santa dan Bambang 1992; Lasmadiwati *et al.*, 2004).

Selain di Indonesia pegagan juga dikenal di India dan Sri Lanka dengan nama Gotu Kola dan di Cina dikenal dengan nama Ji Xue Cao yang digunakan untuk memperpanjang umur menurut kepercayaan masyarakat di Cina. Pegagan di negara Perancis dikenal dengan nama Bevilaque, Hydrocote d'Asie, Cotyiole Asiatique dan sudah ditetapkan sebagai tanaman obat sejak tahun 1884. Pegagan di berbagai negara sudah secara turun temurun digunakan sebagai obat tradisional untuk berbagai jenis penyakit (Winarto dan Surbakti, 2005).

Pegagan berbentuk herba tahunan yang aromatik. Batangnya sangat pendek dari batang tumbuh geragih atau stolon yang melata di permukaan tanah dengan panjang 10-50 cm. Daun tunggal, tersusun dalam bentuk roset yang terdiri dari 2-10 lembaran daun, kadang-kadang agak berambut. Tangkai daun panjangnya sampai 40 cm. Selain daun berbentuk ginjal, lebar dan bundar dengan garis tengah sampai 10 cm, pinggir daun beringgit dan bergerigi. Pangkal dari tangkai daun melekuk ke dalam dan melebar seperti pelepah. Tulang daun menjari dan akar bercabang. Bunga berbentuk payung tunggal, biasanya tersusun dari 3 bunga. Tangkai bunga panjangnya 5-50 mm, lebih pendek dari tangkai daun. Daun pelindung berjumlah 2 dan panjangnya 3-4 mm berbentuk telur (BPOM RI, 2010).



Gambar 2.1 Pegagan (*Centella asiatica*) (Vohra, 2011)

2.1.2 Manfaat Pegagan

Manfaat tanaman pegagan diantaranya adalah 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 di Cina, telah ribuan tahun digunakan sebagai tonikum, sedangkan di Malaysia, pegagan telah lama digunakan untuk mengobati bronkitis, asma, pengeluaran getah lambung yang berlebihan (*maag*), keputihan, gangguan ginjal serta radang saluran kencing. Pegagan di timur jauh Eropa digunakan untuk

menyembuhkan penyakit Lepra dan TB. Pegagan mampu menyembuhkan penyakit Lepra dan TB dengan cara mengikis zat semacam lilin yang melindungi bakteri sehingga bersamaan dengan obat akan lebih mudah untuk membasmi penyakit tersebut (Suryo, 2010).

Di Sunda masyarakat biasa menggunakan pegagan sebagai lalapan bagi orang yang menderita kepikunan. Pegagan bersifat sebagai *Brain Tonic* dan karena kemampuannya sering disebut makanan otak. Selain khasiatnya yang mampu mengembalikan kemampuan otak dan daya ingat, pegagan juga kaya akan antioksidan. Pegagan pun dikenal untuk revitalisasi sel tubuh dan kesuburan wanita, memperbaiki sirkulasi dengan revitalisasi pembuluh darah (mempertinggi permeabilitas kapiler), menurunkan tekanan darah, mengobati stroke, mengatasi peradangan (radang paru-paru, tenggorokan, lambung), dan mengobati bronkhitis (Suryo, 2010).

2.1.3 Kandungan Senyawa Kimia Pegagan

Pegagan bermanfaat sebagai tanaman obat karena mengandung komponen fitokimia seperti: triterpenoid, saponin, flavonoid, tanin, steroid dan glikosida. Zat aktif yang terdapat dalam pegagan adalah antara lain asiaticosida, asam asiatik, asam madekasik dan madekasosida (golongan triterpenoid), sitosterol dan stigmasterol (golongan steroid) dan vallerin, brahmosida (golongan saponin). Kandungan kimia yang terdapat pada pegagan yang lain yaitu *asiaticoside*, *thankuniside*, *isothankuniside*, *madecacoside*, *brahmoside*, *brahminoside*, *brahmic acid*, *madasiatic*

acid, meso-inositol, centelloside, carotenoids, hydrocotylin, vellarine, tanin serta mempunyai kandungan garam mineral seperti kalium, natrium, magnesium, kalsium dan besi mengandung fosfor, minyak atsiri (1%), pektin (17.25%), asam amino dan vitamin (Santa dan Bambang 1992; Kusuma et al. 1994; Lasmadiwati et al. 2004).

Triterpenoid adalah senyawa yang kerangka karbonnya berasal dari enam satuan isoprene dan secara biosintesis diturunkan dari hidrokarbon C₃₀ asiklik, yaitu skualena. Senyawa ini berstruktur rumit kebanyakan berupa alkohol, aldehid atau asam karbosilat. Mereka merupakan senyawa tidak berwarna, berbentuk kristal, seringkali bertitik leleh tinggi. Triterpenoid dapat dibedakan menjadi sekurang-kurangnya empat golongan senyawa: triterpenoid sebenarnya, steroid, saponin dan glikosida jantung. Kedua golongan terakhir sebenarnya triterpen atau steroid, terutama terdapat sebagai

Saponin triterpenoid diperlukan untuk pertumbuhan tanaman dan perkembangan yang memiliki peran ekologi dalam mengatur interaksi antara tanaman dan lingkungannya, dimana kelompok dominan adalah triterpenoid pentasilik derivatif dan sapogenin. Saponin triterpenoid ini merupakan metabolit sekunder yang dapat menjadi zat defensif seperti fitoantisipin, antifeedant, atraktan, fitoaleksin dan feromon (Joshi 2013).

2.2 Kultur Jaringan Tanaman

2.2.1 Pengertian Kultur Jaringan

Kultur jaringan adalah istilah yang ditunjukkan pada budidaya secara *in vitro* terhadap berbagai bagian tanaman yang meliputi batang, daun, akar, bunga, kalus, sel, protoplas, dan embrio. Bagian-bagian tersebut seperti eksplan, diisolasi dari kondisi *in vivo* dan dikultur pada media buatan yang steril sehingga dapat bergenarasi dan berdiferensiasi menjadi tanaman lengkap (Zulkarnain, 2009).

Teknik kultur jaringan tumbuhan merupakan suatu metode untuk mengisolasi bagian dari tanaman seperti protoplasma sel, sekelompok sel jaringan dan organ serta menumbuhkannya dalam kondisi aseptik, sehingga bagian-bagian tersebut dapat memperbanyak diri dan bergenerasi menjadi tanaman lengkap (Gunawan, 1998).

Berbeda dengan teknik perbanyakan vegetatif secara konvensional, teknik kultur jaringan melibatkan pemisahan sejumlah komponen biologis dan tingkat pengendalian yang tinggi untuk memacu proses regenerasi dan perkembangan eksplan. Setiap tahapan dari proses-proses tersebut dapat dimanipulasi melalui seleksi bahan eksplan, medium kultur dan faktor-faktor lingkungan termasuk eliminasi mikroorganisme, seperti cendawan dan bakteri. Semua faktor-faktor tersebut dimanipulasi untuk memaksimalkan hasil yang dicapai dalam bentuk jumlah dan mutu propagul yang didapatkan (Zulkarnain, 2009).

Penerapan kultur jaringan tumbuhan mempunyai beberapa keuntungan dibandingkan dengan penggunaan konvensional. Keuntungan-keuntungan tersebut, antara lain:

- a. Dapat dibentuk senyawa bioaktif dalam kondisi terkontrol dan waktu yang relatif lebih singkat.
- b. Kultur bebas dari kontaminasi mikroba.
- c. Setiap sel dapat dihasilkan untuk memperbanyak senyawa metabolit sekunder tertentu.
- d. Pertumbuhan sel terawasi serta proses metabolismenya dapat diatur secara rasional.
- e. Kultur jaringan tidak bergantung pada kondisi lingkungan seperti keadaan geografi, iklim, musim (Isda, 2009).

2.2.2 Faktor yang Mempengaruhi Pertumbuhan Kultur Jaringan Tumbuhan

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

1. Eksplan

Eksplan merupakan sebutan bagi bahan yang dikulturkan. Harjadi (1989), menjelaskan bahwa bagian tanaman yang digunakan sebagai eksplan mencakup ujung pucuk, irisan-irisan batang, daun, daun bunga, daun keping biji, akar, buah, embrio,

maristem pucuk apikal (yang benar-benar merupakan titik tumbuh) dan jaringan nuselar (Alitalia, 2008).

Eksplan harus diusahakan agar dalam keadaan aseptik melalui prosedur sterilisasi dengan berbagai bahan kimia. Melalui eksplan yang aseptik kemudian diperoleh kultur yang aksenik yaitu kultur dengan hanya satu macam organisme yang diinginkan (Gunawan, 1998).

2. Media

Keberhasilan dalam penggunaan metode kultur jaringan sangat bergantung pada media yang digunakan. Media ini tidak hanya menyediakan unsur hara (mikro dan makro) tetapi juga karbohidrat (gula) untuk menggantikan karbon yang biasanya didapat dari atmosfer melalui fotosintesis. Hasil yang lebih baik akan diperoleh, bila ke dalam media tersebut ditambahkan vitamin, asam amino dan Zat Pengatur Tumbuh (Gunawan, 1998).

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

Umumnya media kultur jaringan tersusun atas komposisi hara makro, hara mikro, vitamin, gula, asam amino dan N-organik, persenyawaan kompleks alamiah (air kelapa, ekstrak ragi, jus tomat, dan sebagainya), buffer, arang aktif, zat pengatur tumbuh (terutama auksin dan sitokinin) dan bahan pematat. Faktor lain yang tidak

kalah penting dalam kultur jaringan adalah pengaturam pH media. Tingkat keasaman media harus diatur supaya tidak mengganggu fungsi membran sel dan pH sitoplasma. Sel-sel tanaman membutuhkan pH yang sedikit asam berkisar antara 5,5-5,8 (Alitalia, 2008).

3. Zat Pengatur Tumbuh

Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) didefinisikan sebagai senyawa organik bukan nutrisi yang aktif dalam jumlah kecil (10^{-6} - 10^{-5} mM) yang disintesis pada bagian tertentu tanaman dan pada umumnya diangkut ke bagian yang lain tanaman dimana zat tersebut menimbulkan tanggapan serta respon biokimia, fisiologis dan morfologis (Wattimena, 1992). Dua golongan zat pengatur tumbuh yang penting dalam kultur jaringan yaitu auksin dan sitokinin. Zat pengatur tumbuh ini mempengaruhi pertumbuhan dan morfogenesis dalam kultur sel dan organ. Interaksi dan perimbangan antara zat pengatur tumbuh yang diberikan dalam media dan yang diproduksi oleh sel secara endogen menentukan arah perkembangan suatu kultur (Gunawan, 1998).

Auksin merupakan salah satu zat pengatur tumbuh tanaman yang aktivasinya dapat merangsang atau mendorong pengembangan sel. Di alam IAA (*Indole Asetic Acid*) dan NAA (*Naphtalene Asetic Acid*) merupakan auksin sintetis (Hoesen, 2000).

Auksin banyak digunakan secara luas pada kultur jaringan dalam merangsang pertumbuhan kalus, suspensi sel dan organ (Gunawan, 1998). Bentuk-bentuk auksin yang biasa ditambahkan ke dalam media kultur adalah 2,4-D (*2,4 Dichlorophenoxy Acetic Acid*), IBA (*Indolebutyric Acid*), NAA (*Naphtalene Acetic Acid*) dan IAA

(*Indole-3-Acetic Acid*). Auksin yang secara alami terdapat dalam tumbuhan adalah IAA.

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

4. Lingkungan Tumbuh

Cahaya dalam kultur jaringan berguna untuk mengatur proses-proses morfogenik tertentu seperti pembentukan pucuk dan akar, tetapi tidak untuk fotosintesis karena sumber energi bagi eksplan telah disediakan oleh sukrosa. Cahaya juga penting dalam pengendalian perkembangan eksplan dan unsur-unsur cahaya perlu diperhatikan adalah kualitas cahaya, panjang penyinaran dan intensitas cahaya. Temperatur ruang kultur juga menentukan respon fisiologi kultur dan kecepatan pertumbuhannya. Berdasarkan hasil penelitian juga dijelaskan bahwa fotosintesis jaringan sebagian besar tergantung pada suplai sukrosa dari luar (medium kultur). Dalam hal ini cahaya sangat penting untuk fotomorfogenesis. Fotomorfogenesis merupakan proses menginduksi perkembangan tanaman dan tidak melibatkan energi cahaya dalam jumlah besar. Reaksi morfogenesis dibagi menurut tipe bagian spektrum yang menghasilkan respon. Respon yang utama adalah yang diinduksi oleh spektrum cahaya merah atau biru (Alitalia, 20008).

Intensitas cahaya yang rendah dapat mempertinggi embriogenesis dan organogenesis. Intensitas cahaya optimum pada kultur 0-1000 ux (inisiasi), 100-10000 lux (multiplikasi), 10000-30000 lux (pengakaran), dan < 30000 lux untuk aklimatisasi (Santoso, 2004).

Temperatur yang umum digunakan untuk kultur berbagai tanaman adalah $\pm 20^{\circ}$ C. Suhu yang terlalu rendah dapat menghambat pertumbuhan tanaman dan suhu yang terlalu tinggi dapat mematikan tanaman. Temperatur optimum tergantung jenis tanaman, sedangkan temperatur normal berkisar antara 22°C sampai 28°C (Santoso, 2004).

2.2.3 Zat Pengatur Tumbuhan

Menurut Sinaga (1987), zat pengatur tumbuh tanaman adalah senyawa-senyawa organik selain nutrisi tumbuhan, yang dalam jumlah sedikit dapat mendukung, menghambat, serta dapat mempengaruhi setiap proses fisiologis tumbuhan. Hormon tumbuhan (*plant hormone*) merupakan zat organik yang dihasilkan oleh tumbuhan atau buatan (hormon sintetis), yang dalam konsentrasi rendah dapat mengatur proses fisiologis. Hormon biasanya bergerak dari bagian tanaman yang menghasilkan menuju kebagian tanaman lainnya (Abidin, 1983).

Terdapat lima katrgori utama zat pengatur tumbuh, yaitu auksin (IAA, NAA, IBA dan 2,4-D), giberelin, sitokonin (kinetin, benziladenil, zeatin), etilen dan penghambat pertumbuhan seperti asam absisat (ABA) (Schirmer, 2012).

Auksin yang paling banyak digunakan adalah IAA (*Indole-3-Acetic Acid*), yang disintesis pada bagian tertentu seperti daun muda dan biji yang sedang berkembang. Sedangkan auksin sintetik yang biasa digunakan adalah 2,4-D (Zulkarnain, 2009).

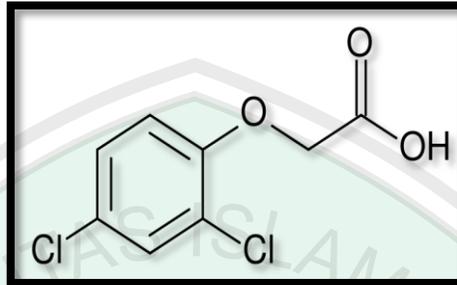
2.2.3.1 ZPT 2,4-D (*2,4 Dichlorophenoxyacetic Acid*)

2,4-D (*2,4 Dichlorophenoxyacetic Acid*) merupakan jenis dari auksin sintetik yang banyak ditambahkan ke dalam medium kultur jaringan. 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).

2,4-D merupakan auksin kuat yang sering digunakan secara tunggal untuk menginduksi terbentuknya kalus dari berbagai jaringan tanaman (Bhojwani dan

Razdan, 1996). Pemberian ZPT 2,4-D secara tunggal dapat merespon terjadinya inisiasi pembentukan kalus.



Gambar 2.2 Struktur kimia 2,4-D (2,4 *Dichlorophenoxyacetic Acid*) (Zulkarnain, 2009).

2.2.3.2 Air Kelapa

Air kelapa mengandung hormon alami yang termasuk dalam golongan sitokinin. Air kelapa merupakan senyawa organik yang sering digunakan dalam aplikasi teknik kultur jaringan. Hal ini disebabkan air kelapa mengandung 1,3-diphenilurea, zeatin, zeatin glukosida, dan zeatin ribosida. Air kelapa merupakan air alami steril yang mengandung kadar K dan Cl tinggi. Selain itu, air kelapa mengandung sukrosa, fruktosa, dan glukosa (Kristina, 2012).

Kandungan utama air kelapa adalah air (94%) dan substansi untuk meningkatkan pertumbuhan yang dapat mempengaruhi kultur *in vitro*. Kandungan tersebut antara lain ion-ion organik, asam amino, asam organik, vitamin, gula, gula alkohol, lipid, komponen nitrogen dan fitohormon (Al-Khayri, 2010). Air kelapa telah banyak digunakan sebagai suplemen dalam kultur jaringan pada berbagai konsentrasi. Air kelapa mengandung auksin, berbagai macam sitokinin, gas dan ABA (Yong, 2009).

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 Teknik Kultur Kalus Untuk Memproduksi Metabolit Sekunder

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

Berdasarkan perubahan ukuran sel, metabolisme dan penampakan kalus, proses perubahan dari eksplan menjadi kalus dapat dibagi menjadi tiga tahap yaitu induksi, pembelahan dan diferensias. Pada tahap induksi sel siap untuk membelah, metabolisme menjadi aktif dan ukuran sel tetap konstan. Tahap pembelahan, sel aktif

membelah atau bersifat maristematik dan terjadi penurunan ukuran sel. Akhir pertumbuhan kalus ditandai dengan peningkatan diferensiasi dicirikan dengan pembesaran sel, sel menjadi bervakuola dan penurunan laju pembelahan (Alitalia, 2008).

Pertumbuhan kalus dapat digambarkan dalam bentuk kurva sigmoid, biasanya terdiri dari lima fase yaitu (1) Fase lag, sel siap untuk membelah. (2) Periode pertumbuhan eksponensial, pembelahan sel secara maksimal (3) Periode pertumbuhan linear, pembelahan sel dan pembesaran sel menurun (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 makanan sel atau akumulasi. Pada fase stasioner pertumbuhan terhenti dan terjadi kematian sel, hal ini karena sejumlah nutrisi telah berkurang atau menjadi akumulasi senyawa toksik yang dikeluarkan kalus dalam medium. Pada fase ini harus dilakukan subkultur agar kalus tetap hidup (Darwati, 2007).

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).

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 Sujuta *et al.*, (2011), menambahkan bahwa kultur jaringan tanaman obat-obatan lebih cenderung melalui proses pembentukan organogenesis secara tidak

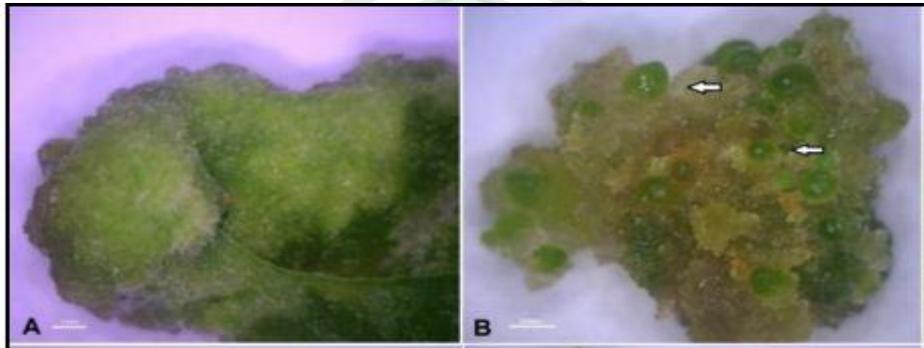
langsung. Ini berkaitan dengan tujuan produksi bahan metabolit sekunder, karena selalu melibatkan penghasilan agregat–agregat sel yang dikultur dalam kultur suspensi sebelum ke sistem bioreaktor, sehingga kebanyakan sasaran awal adalah untuk mendapatkan kalus (Maharjan *et al.*, 2010).

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 dimanipulasi pemakaian Zat Pengatur Tumbuh.

2.3.1 Tekstur Kalus

Bentuk kalus dapat dibedakan berdasarkan tekstur dan sifat fisik. Berdasarkan tekstur kalus dibedakan atas kalus kompak dan kalus friabel. Kalus kompak yaitu kalus yang terbentuk dari sekumpulan sel yang kuat. Sedangkan kalus yang terdiri dari sel-sel yang lepas disebut kalus friable. Kalus friable sangat cocok digunakan untuk pertumbuhan sebagai kalus suspenses. Kalus kompak dapat menjadi kalus friable akan tetapi kalus friabel tidak dapat menjadi kalus kompak. Kalus friabel dan kalus kompak mempunyai komposisi kimia yang berbeda. Kalus kompak mempunyai

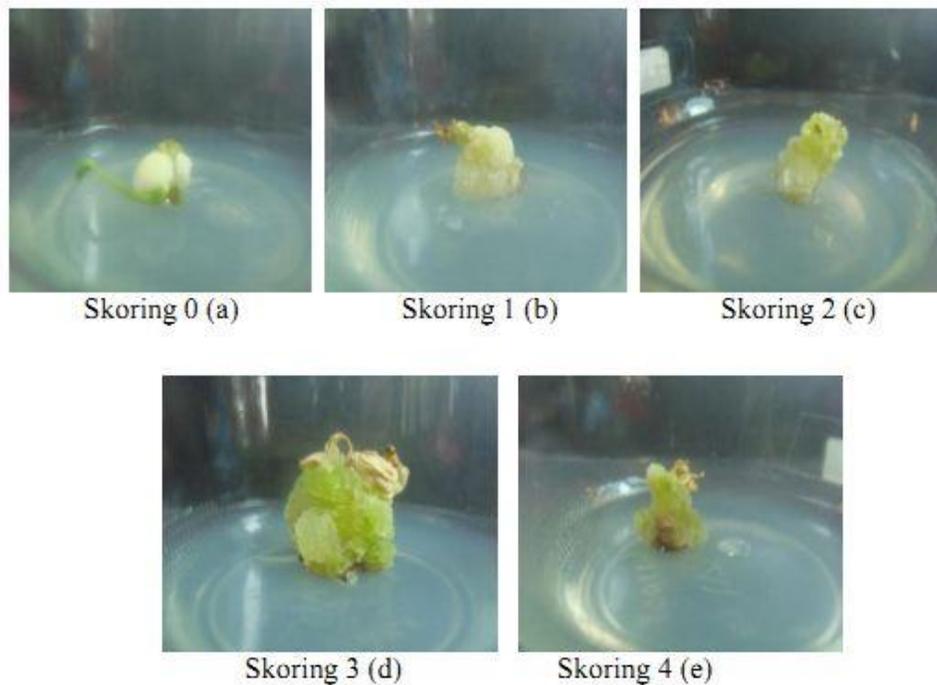
kandungan polisakarida dengan pektin dan hemiselulosa. Kandungan selulosa yang tinggi meningkatkan sel lebih rigid. Pektin yang tinggi sel lebih kuat dapat menahan fragmentasi (Alitalia, 2008).



Gambar 2.3 Tekstur kalus (A) tekstur kalus kompak, (B) tekstur kalus remah (Mohajer, 2012)

2.3.2 Warna Kalus

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



Gambar 2.4 Kategori scoring warna kalus pada eksplan jarak pagar (a) kalus berwarna putih (b) kalus berwarna hijau (c) kalus berwarna hijau kekuningan (d) kalus berwarna hijau (e) kalus berwarna hijau kecoklatan (Andaryani,2010).

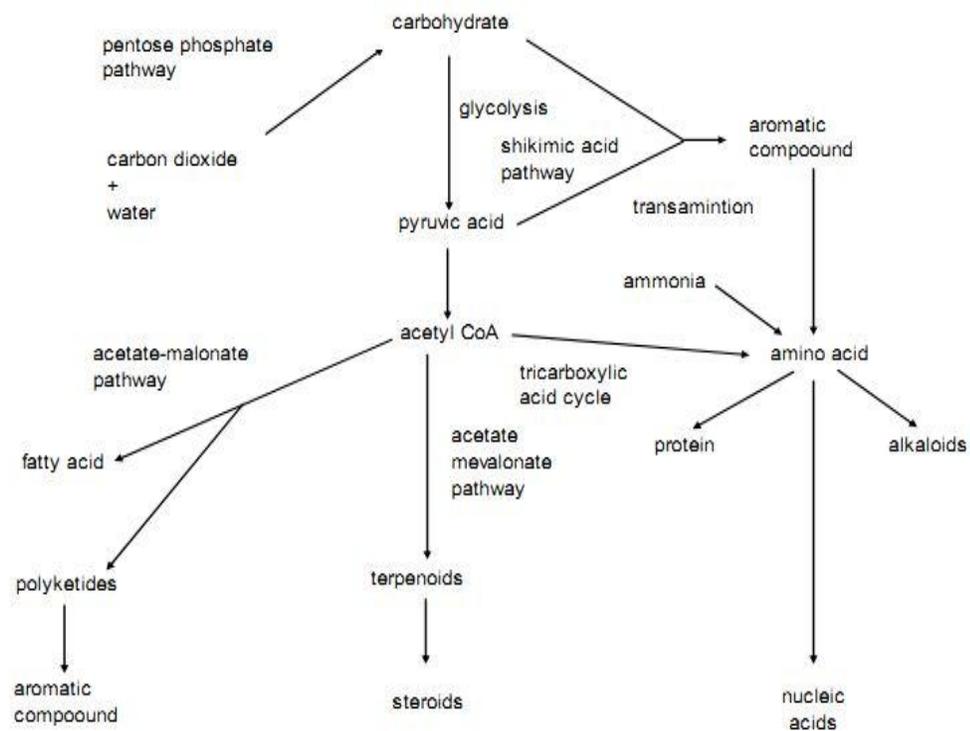
2.4 Metabolit Primer

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

Metabolisme primer pada tumbuhan, seperti respirasi dan fotosintesis, merupakan proses yang esensial bagi kehidupan tumbuhan. Tanpa adanya

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

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



Gambar 2.5 Skema biosintesis metabolit primer (Vickery dan Vickery 1981).

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 serangga, sebagai pertahanan terhadap tanaman lain melalui allelopati, sebagai antrakan untuk membantu serangga polinasi, dan sebagai obat, *food additive*, flavor, pewarna dan pestisida nabati (Darwati, 2007).

Produk senyawa metabolit sekunder pada tanaman mempunyai variabilitas yang tinggi karena sangat tergantung dengan kondisi iklim, hama dan penyakit serta kondisi fisiologis tanaman tersebut. Senyawa dari tanaman tersebut sangat kompleks sehingga terkadang untuk pembuatannya secara sintesis sangat sulit dan mahal. Oleh karena itu sejumlah produk alami mempunyai nilai ekonomi tinggi masih diekstrak dari tanaman. Akan tetapi keperluan dalam skala besar masih sulit dipenuhi karena senyawa alami diproduksi tanaman dalam jumlah sedikit dan jaringan yang spesifik seperti akar. Untuk memenuhi kebutuhan yang tinggi diperlukan penanaman dalam skala luas agar diperoleh akar yang banyak (Darwati, 2007).

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

Kultur *in vitro* pada media yang optimum, umumnya produksi metabolit sekunder dihasilkan pada akhir stasioner. Pertumbuhan yang terhambat sering diasosiasikan dengan sitodiferensiasi dan induksi enzim untuk metabolit sekunder. Modifikasi media pertumbuhan untuk produksi metabolit sekunder antara lain : mengurangi Zat Pengatur Tumbuh, mengurangi konsentrasi fosfat, meningkatkan gula atau alternatif lain sebagai sumber C/N (Bhojwani dan Razdan, 1996).

Peningkatan metabolit sekunder dengan memanipulasi media kultur yaitu member perkusor dan ekstrak jaringan (Darwati, 2007).

Penyebaran metabolit sekunder terbatas, terdapat terutama pada tumbuhan dan mikroorganisme serta memiliki karakteristik untuk tiap generasi, spesies, dan strain tertentu. Metabolit sekunder dibentuk dari metabolit primer antara lain asam amino, asetil koenzim A, asam mevalonat, dan intermediate dari lintasan shikimat (Herbert 1995). Metabolit sekunder dibagi menjadi kelompok terpenoid, alkaloid, shikimat dan poliketida berdasarkan pentingnya material pembentukannya (Sell 2005).

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

Selain itu metabolit sekunder ada juga yang disebut dengan fitoaleksin. Fitoaleksin adalah zat toksin yang dihasilkan oleh tanaman dalam jumlah yang cukup hanya dirangsang oleh berbagai mikroorganisme patogenik atau oleh kerusakan mekanis dan kimia. Fitoaleksin dihasilkan oleh sel sehat yang berdekatan dengan sel-

sel rusak dan nekrotik sebagai jawaban terhadap zat yang berdifusi dari sel yang rusak. Fitoaleksin terakumulasi mengelilingi jaringan nekrosis yang rentan dan resisten. Ketahanan terjadi apabila satu jenis fitoaleksin atau lebih mencapai konsentrasi yang cukup untuk mencegah patogen berkembang (Agrios, 1997).

Fitoaleksin merupakan senyawa kimia yang berasal dari derivat flavonoid dan isoflavonoid, turunan sederhana dari fenilpropanoid, dan derivat dari sesquiterpen. 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 asam mevalonat dan jalur deoksisiluloadifosfat. Biosintesis fitoaleksin menggunakan perkursor yang berasal dari jalur metabolit sekunder (Hammerschmidt, 1999).

Senyawa metabolit sekunder yang paling banyak dikandung tanaman pegagan adalah dari kelompok triterpenoid. Sedangkan geranyl pyrophosphate menjadi prekursor dari diterpenoid dan carotenoid (Vickery dan Vickery, 1981). Triterpenoid merupakan senyawa yang memiliki struktur molekuler yang mengandung rangka karbon dan membentuk isoprene (2-methylbuta-1.3-diene). Isoprene mempunyai lima atom karbon, sedangkan jumlah atom karbon pada masing-masing senyawa terpenoid merupakan kelipatan lima karbon (isoprene) (Sell 2005). Secara jelas biosintesis senyawa triterpenoid ditunjukkan pada glikosida. Saponin merupakan senyawa aktif permukaan dan bersifat seperti sabun serta dapat dideteksi berdasarkan kemampuannya membentuk busa dan menghemolisis sel darah. Pola glikosida saponinnya yang rumit memiliki banyak saponin yang mempunyai satuan gula

sampai lima dan komponen yang umum yaitu asam glukuronat (Harbone, 1978). Berbeda dengan saponin steroida, saponin triterpenoid jarang terdapat pada monokotil, tetapi banyak terdapat pada tanaman dikotil terutama Caryo phylaceae, Sapindaceae, Polygalaceae dan Sapotaceae. Saponin triterpenoid dapat dibedakan dalam tiga golongan yang diwakili oleh α -amirin dan β -amirin dan lupeol. Asam triterpenoid yang sekerabat dibentuk dari senyawa-senyawa tersebut dengan menggantikan gugus metal dengan gugus karboksil (Brotosisworo, 1979).

2.6 Biosintesis Senyawa Asiatikosida dan Madekasosida

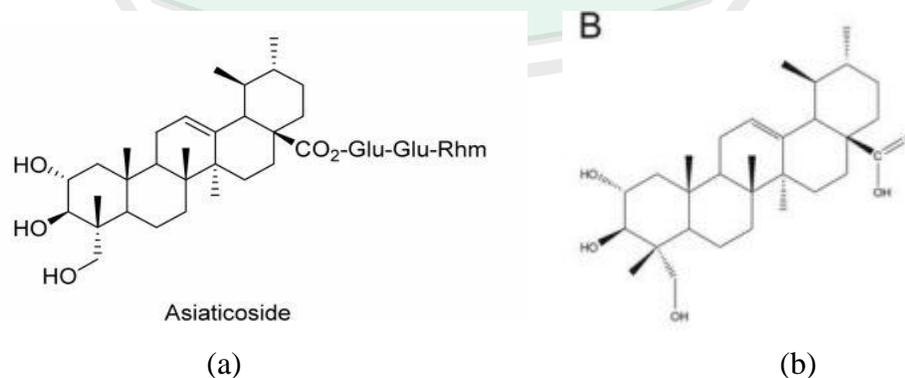
2.6.1 Senyawa Asiatikosida dan Madekasosida

Asiatikosida adalah senyawa golongan glikosida triterpenoid sebagai senyawa identitas pegagan. Asiatikosida mengandung glikon yang terdiri dari satu molekul ramnosa dan dua molekul glukosa. Aglikon triterpen dari asiatikosida ini disebut asam asiatikat yang memiliki gugus alkohol primer, glikol dan satu buah karboksilat teresterifikasi dengan gugus gula (Pramono, 1992).

Bermacam-macam kandungan kimia dari daun pegagan antara lain senyawa glikosida triterpenoid yang disebut asiatikosida (suatu senyawa heteroside) yang merupakan senyawa metabolit sekunder yang termasuk dalam kelompok terpena ini berkhasiat untuk mempercepat penyembuhan luka, asam asiatikat dan madekasat (Haralampidis *et al.*, 2002). Kandungan asiatikosida membuat pegagan berfungsi sebagai antinflamasi sehingga dapat diolah menjadi bahan baku salep untuk mengobati luka (Lasmadiwati *et al.*, 2005).

Madekasosida merupakan triterpen utama pada herba pegagan, yang struktur kimianya hanya memiliki perbedaan satu gugus hidroksi saja dengan asiaticosida. Madekasosida merupakan bahan aktif kosmetik yang digunakan sebagai 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 tentang senyawa madekasosida telah dilakukan. Pemberian madekasosida pada dosis tinggi (12 dan 24 mg/kg BB) dapat menurunkan kadar nitrit oksida (NO) dan malondialdehid (MDA) pada jaringan kulit yang terbakar, sementara kadar reduksi glutathion (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 (a) asiaticosida (b) madekasosida (Jeong, 2007).

2.6.2 Biosintesis Senyawa Asiatikosida dan Madekasosida

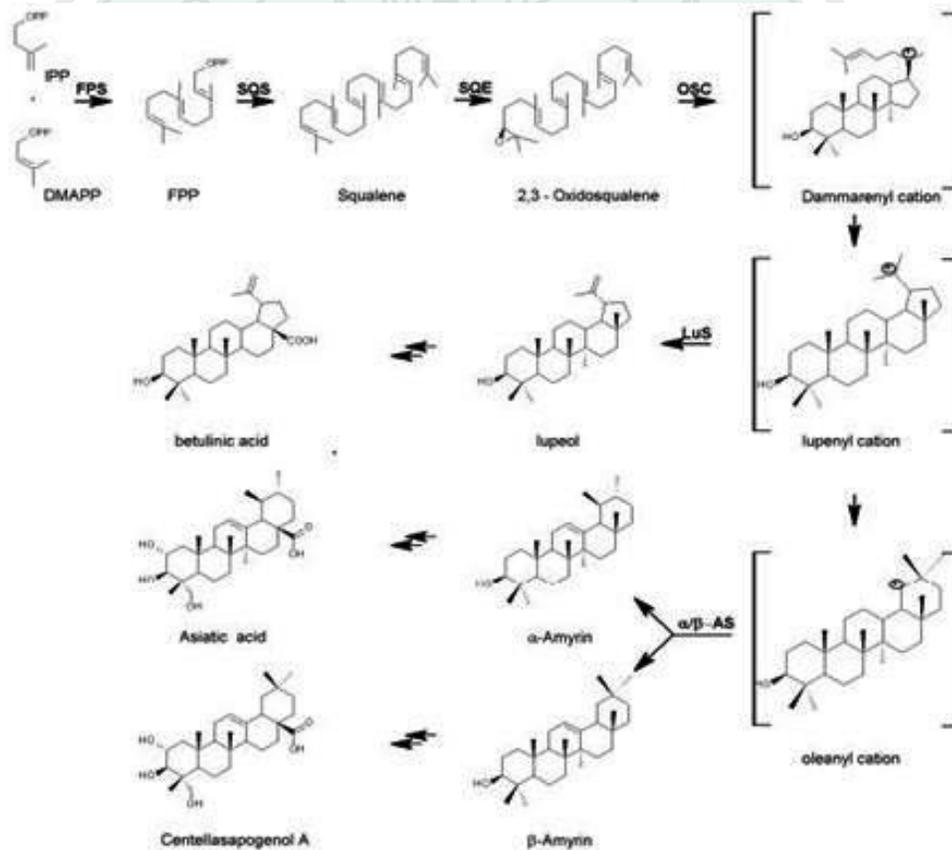
Mekanisme dari tahap-tahap reaksi biosintesis terpenoid adalah asam asetat setelah diaktifkan oleh koenzim A melakukan kondensasi jenis Claisen menghasilkan asam asetoasetat. Senyawa yang dihasilkan ini dengan asetil koenzim A melakukan kondensasi jenis aldo menghasilkan rantai karbon bercabang sebagaimana 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 dari kepala ke ekor dengan DMAPP dan penggabungan ini merupakan langkah pertama dari polimerisasi isopren untuk menghasilkan terpenoid (Lenny, 2006).

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 (Lenny, 2006).

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).

Selanjutnya yaitu terjadi sintase squalena (SQS) berubah menjadi squalena. Squalena epiohidrase (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 sintahse (α/β -AS) yang juga dapat membentuk kation lupenil tapi ekspansi dan penyusunan ulang cincin lebih cepat diperlukan sebelum deprotonasi untuk α/β -Amarin, perkursor dari sapogenins, untuk menghasilkan produk (James, 2009).



Gambar 2.7 Skema biosintesis senyawa asiatikosida dan madekasosida (James, 2009)

2.7 Elisitasi

Elisitasi adalah suatu metode untuk meningkatkan fitoaleksin dan metabolit sekunder lainnya dengan menambahkan berbagai elisitor biotik maupun abiotik (Pandiangan, 2011). Elisitor dapat berupa biotik maupun abiotik. Setiap tipe elisitor berdasarkan karakteristiknya masing-masing dapat menginduksi respon spesifik yang tergantung pada interaksi kultur tumbuhan dan elisitor. Elisitor biotik berasal dari makhluk hidup, dari patogen atau tumbuhan itu sendiri. Elisitor abiotik berupa faktor fisika atau senyawa kimia (Vasconsuelo dan Boland, 2007). Salah satu pengaruh yang ditimbulkan oleh elisitor adalah adanya depolarisasi 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 dan weiler, 1999).

Elisitasi dipengaruhi oleh spesifikasi elisitor, konsentrasi elisitor yang ditambahkan dan kondisi kultur (Vanconseulo dan Boland 2007; Rhijwani dan Shanks 1998). Berapa faktor yang mempengaruhi metabolit ssekunder dalam kultur yang dielisasi antara lain macam elisitor, konsentrasi elisitor, waktu kontak elisitor dan fase pertumbuhan, galur sel yang digunakan, waktu penambahan elisitor dan fase pertumbuhan sel dalam kultur, serta nutrien yang digunakan dalam medium (Pandiangan, 2011).

Mekanisme elisitasi dalam menginduksi senyawa fitoaleksin pada jaringan tumbuhan dapat diduga dengan cara menstimulasi senyawa mRNA melalui suatu peningkatan dalam transkripsi gen-gen yang terlibat dalam pembentukan fitoaleksin

dan senyawa metabolit sekunder lainnya. Peningkatan elisitor dalam kultur jaringan suatu tumbuhan dilakukan oleh membran plasma (Angel, 2006).

Oku (1994) menyatakan terdapat dua hipotesis mengenai pengenalan elisitor oleh sel-sel inang yaitu :

1. Elisitor secara langsung berikatan dengan DNA yang terdapat pada inti sel tumbuhan sehingga dapat mengaktifkan transkripsi gen-gen untuk biosintesa fitoaleksin dan senyawa metabolit lainnya.
2. Pada membran sel tumbuhan terdapat reseptor elisitor. Sama halnya dengan hipotesis pertama yaitu transduksi sinyal pada sel tumbuhan melalui Ca^{2+} yang bertindak sebagai *second messenger*. Reseptor yang terdapat pada membran sel berfungsi sebagai sensor sinyal eksternal yang kemudian dihantarkan ke dalam sistem *messenger intercellular* melalui aktivasi adenilat siklase atau aktivasi fosfolipase. Proses ini akan memacu respon seluler pada sel terhadap rangsangan eksternal untuk kemudian sel mengubah ekspresinya. Dmitrev dan Silalahi (1999), menjelaskan bahwa akan terjadi peningkatan reaksi enzim-enzim dalam proses elistasi yang diduga karena peningkatan elisitor pada reseptor membran plasma menyebabkan peningkatan Ca^{2+} intarseluler yang bertindak sebagai *second messenger* untuk menginduksi transkripsi dan translasi enzim-enzim yang terlibat dalam jalur metabolit sekunder.

2.8 Peran Besi (Fe²⁺) sebagai Elisitor Abiotik

Besi adalah logam yang keberadaannya memiliki jumlah besar dan beragam penggunaannya. Hal ini disebabkan beberapa hal yaitu kelimpahan besi dikulit bumi cukup besar, pengolahannya relatif mudah dan murah, serta besi mempunyai sifat-sifat yang menguntungkan dan mudah dimodifikasi. Logam ini kelimpahannya berada pada urutan kedua. Karena kelimpahannya, di dalam masyarakat besi sangat banyak dimanfaatkan antara lain kemudahannya dalam perolehan atau proses penambangan bijihnya dan ditemukan di banyak tempat (Canham dan overtone, 2003).

Firman Allah dalam surat Al-Hadid ayat 25 adalah :

لَقَدْ أَرْسَلْنَا رُسُلَنَا بِالْبَيِّنَاتِ وَأَنْزَلْنَا مَعَهُمُ الْكِتَابَ وَالْمِيزَانَ لِيَقُومَ النَّاسُ بِالْقِسْطِ وَأَنْزَلْنَا الْحَدِيدَ فِيهِ بَأْسٌ شَدِيدٌ وَمَنْفَعٌ لِلنَّاسِ وَلِيَعْلَمَ اللَّهُ مَنْ يَنْصُرُهُ وَرُسُلَهُ بِالْغَيْبِ إِنَّ اللَّهَ قَوِيٌّ عَزِيزٌ ﴿٢٥﴾

Artinya: “*Sesungguhnya Kami telah mengutus Rasul-rasul Kami dengan membawa bukti-bukti yang nyata dan telah Kami turunkan bersama mereka Al kitab dan neraca (keadilan) supaya manusia dapat melaksanakan keadilan. dan Kami ciptakan besi yang padanya terdapat kekuatan yang hebat dan berbagai manfaat bagi manusia, (supaya mereka mempergunakan besi itu) dan supaya Allah mengetahui siapa yang menolong (agama)Nya dan rasul-rasul-Nya Padahal Allah tidak dilihatnya. Sesungguhnya Allah Maha kuat lagi Maha Perkasa.*” (Q.S. Al-Hadid :25).

Ayat di atas menjelaskan bahwa Allah SWT menurunkan besi yang mengandung kekuatan hebat untuk keperluan militer dan beraneka faidah untuk perindustrian dan pertanian, supaya Allah SWT mengetahui siapa yang menolong agama-Nya dan para rasul-Nya, padahal dia tidak melihat Allah SWT yakni dengan

cara menyangkal senjata di jalan Allah SWT demi menjaga agama-Nya dan membela hamba-hamba-Nya (Al-Qarni,2007). Jadi Allah SWT telah menciptakan besi untuk dimanfaatkan. Salah satu manfaatnya bisa digunakan sebagai elisitor.

Besi merupakan salah satu unsur hara mikro dalam tumbuhan. Besi berperan dalam proses pembentukan klorofil, pembawa elektron dalam proses fotosintesis dan respirasi, serta menjadi aktivator beberapa enzim (Agrosains, 2007). Fungsi besi (Fe) yaitu mengaktifkan enzim hidrogenase fumarat, oksidasi, sitokrom, katalase, peroksidase dan sebagainya yang memiliki peranan penting sebagai katalisator reduksi-oksidasi. Kekurangan besi (Fe) menyebabkan terhambatnya pembentukan klorofil dan akhirnya juga penyusunan protein menjadi tidak sempurna. Defisiensi besi (Fe) menyebabkan kenaikan kadar asam amino pada daun dan penurunan jumlah ribosom secara drastis (Rosmarkam,2002).

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

1. Stress Oksidatif (Cekaman)

Ion logam Fe^{2+} berperan dalam pengaturan respon pertahanan diri pada tanaman dengan cara menginduksi gen dan meningkatkan jalur pembentukan metabolit sekunder. Fungsi elisitor abiotik ini sebagai signal transduksi pada sistem pertahanan diri tanaman terhadap stress akibat adanya cekaman lingkungan untuk memproduksi metabolit sekunder (Muryanti, 2005). Tumbuhan yang mulai mendapatkan cekaman dari luar akan mengalami tanda bahaya yang ditandai dengan terganggunya fungsi fisiologis dari proses fisiologis yang biasanya. Selanjutnya akan

berlangsung tahap resistensi yaitu berlangsungnya proses adaptasi tanaman pada faktor cekaman lingkungan kemudian jika faktor cekaman meningkat dan terus berlangsung maka tanaman akan mengalami kematian (Salisbury dan Ross, 1995).

2. Kofaktor enzimatik

Fe merupakan elemen penting bagi protein yang terlibat dalam proses seluler dari tumbuhan tingkat tinggi terutama fotosintesis dan respirasi (Kampfenkel, 1995). Peranan Fe^{2+} pada metabolisme dapat mengacu pada proses enzimatik. Awalnya ion logam ini akan dapat menembus membran sel, kemudian elisitor ini masuk dalam reaksi metabolisme tumbuhan dan membentuk metabolit primer dan sekunder. Di dalam proses pembentukan fitoaleksin dan senyawa-senyawa metabolit lainnya. Selain itu menurut Hudoyono (2004), elisitor Fe^{2+} juga berperan sebagai kofaktor yang akan menempel pada sisi non protein pada enzim pemacu metabolit sekunder jenis terpenoid dari jalur isoprene. Enzim yang dapat memacu pembentukan terpenoid antara lain adalah enzim IPP isomerase, GPP sintetase, FPP sintetase, skualena sintetase, dan Squalena epoksidase.

2.9 Metode KCKT (Kromatografi Cair Kinerja Tinggi)

KCKT (Kromatografi Cair Kinerja Tinggi) adalah teknik pemisahan berdasarkan fase diam padat kolom nukleosil C_{18} dan fase gerak cair (metanol-air dengan perbandingan 10:90) dengan tekanan tinggi, sehingga terjadi pemisahan partisi, adsorpsi ataupun penukaran ion, tergantung fase diam yang digunakan. pada ekstrak kental kalus dan daun dilakukan analisa kualitatif secara KCKT untuk

mengetahui profil kromatogram senyawa metabolit sekunder yang terkandung di dalamnya. Pada panjang gelombang (λ) 230 nm dan 300 nm. Volume injeksi 20 μ l (Gangga, 2007).

2.10 Pertumbuhan dan Perkembangan Tanaman dalam Al-Qur'an

Pertumbuhan dan perkembangan tumbuhan merupakan proses yang penting dalam kehidupann dan perkembangbiakan suatu spesies. Pertumbuhan dan perkembangan tumbuhan berlangsung secara terus menerus sepanjang daur hidup, bergantung pada tersediannya hasil asimilasi serta iklim yang mendukung. Pertumbuhan dalam arti sempit berarti pembelahan sel (peningkatan jumlah) dan perbesaran sel (peningkatan ukuran). Kedua proses ini merupakan proses yang tidak dapat dan saling berkaitan satu sama lain. Sedangkan pertumbuhan dalam arti luas dapat didefinisikan sebagai penambahan massa atau dimensi satu organ tumbuhan dalam interval waktu satu fase tertentu atau dalam keseluruhan siklus hidup tumbuhan.

Selain pertumbuhan, tumbuhan juga mengalami perkembangan. Perkembangan tumbuhan merupakan suatu kombinasi dari sejumlah proses yang kompleks yaitu proses pertumbuhan dan diferensiasi (*differentiation*). Proses yang terjadi dalam perkembangan tumbuhan dapat salah satu atau lebih dari ketiga respon, yaitu penebalan dinding sel, penyimpanan hasil fotosintesis pada sebagian sel dan pengerasan protoplasma.

Firman Allah dalam surat Al-An'am ayat 95 berikut mengungkapkan pertumbuhan dan perkembangan tanaman:

﴿ إِنَّ اللَّهَ فَالِقُ الْحَبِّ وَالنَّوَىٰ ۖ يُخْرِجُ الْحَيَّ مِنَ الْمَيِّتِ وَيُخْرِجُ الْمَيِّتَ مِنَ الْحَيِّ ۚ ذَٰلِكُمْ اللَّهُ فَالِقُ الْحَبِّ وَالنَّوَىٰ ۗ فَآنَىٰ تُؤَفَّكُونَ ۗ ﴾

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

Thabari (2008), “*Sesungguhnya Allah menumbuhkan butir tumbuh-tumbuhan dan biji buah-buahan. فَالِقُ الْحَبِّ bahwa maksudnya adalah mengeluarkan dari tangkai (seperti gandum). Sedangkan فَالِقُ النَّوَاةِ maksudnya adalah mengeluarkan dari pohon kurma. Allah SWT menjelaskan bahwa Dialah yang mengeluarkan butir yang mati dari tangkai yang hidup. Dia juga yang mengeluarkan pohon yang hidup dari biji yang mati, dan biji yang mati dari pohon yang hidup. Pohon ketika masih berdiri dan belum kering, dan tumbuhan yang masih berdiri belum kering, dinamakan hayy (hidup) oleh orang Arab. Sedangkan jika telah kering dan batangnya telah runtuh dinamakan mayyit (mati). Firman Allah SWT, ذَٰلِكُمْ اللَّهُ “Demikian ialah Allah, maksudnya yang melakukan hal itu adalah Allah SWT. فَآنَىٰ تُؤَفَّكُونَ “Maka mengapa kamu masih berpaling?” Maksudnya adalah. “Wahai orang-orang bodoh, alasan apa hingga membuat kalian berpaling dari kebenaran? Tidaklah kalian berfikir bahwa tidak pantas bagi Allah SWT untuk disekutukan dengan sesembahan yang tidak bisa*

memberikan manfaat atau mudharat, karena Dialah yang telah mengeluarkan butir dan biji, mengeluarkannya menjadi tanaman yang kalian makan darinya?”

Katsir (2001), menjelaskan Allah SWT memberitahukan bahwa Dialah Yang membelah biji-bijian dan semua bibit tanaman, yakni Dia membelahnya di dalam tanah, lalu menumbuhkan dari biji-biji berbagai macam tanaman, sedangkan dari bibit tanaman Dia keluarkan berbagai macam pohon yang menghasilkan buah-buahan yang berbeda-beda, bentuk dan rasanya.

Kata **الفلق** artinya membelah biji buah-buahan yang mati, lalu mengeluarkan daun yang hijau darinya. Seperti itu juga dengan butir tumbuh-tumbuhan. Lalu, dari daun yang hijau itu Dia mengeluarkan butir-butir tumbuhan yang mati dan biji buah-buahan. Ini juga merupakan makna dari Dia mengeluarkan yang hidup dari yang mati dan mengeluarkan yang mati dari yang hidup. Maksudnya adalah Allah mengeluarkan manusia yang hidup dari sperma yang mati dari manusia yang hidup (Qurthubi, 2008).

Maragi (1992), Sesungguhnya Allah menumbuhkan yang kalian tanam berupa benih tanaman yang dituai dan biji buah juga membelah dengan kekuasaan dan perhitungannya, dengan menghubungkan sebab dan musabab, seperti menjadikan benih didalam tanah, dan menyirami dengan air. Air ini menunjukkan kepada kesempurnaan kekuasaan, kehalusan buatan, dan keindahan kebijakan Allah. Dia mengeluarkan tumbuh-tumbuhan yang tidak berbatang atau yang berbatang.

Itu adalah mukjizat yang tidak diketahui rahasianya oleh seorang pun. Apalagi jika sampai ada yang dapat menciptakannya. Yaitu mukjizat kehidupan, dari timbul

hingga Bergeraknya. Pada setiap saat, terpecahnya biji yang diam dari pepohonan yang tumbuh, dan pecahnya bibit yang statis dari pohon yang menjulang. Kehidupan yang tersimpan dalam biji dan bibit, yang tumbuh dalam tumbuhan dan pepohonan adalah rahasia yang terpendam. Hakikat-Nya hanya diketahui oleh Allah, dan hanya Allah pula yang mengetahui sumbernya. Hanya Allah yang dapat menciptakan kehidupan dari sejak awal hingga mati. Hanya Allah yang dapat menyiapkan makhluk hidup untuk mengubah atom-atom mati menjadi sel-sel yang hidup. Hanya Allah juga yang mampu mengubah sel-sel hidup sekali lagi menjadi atom-atom mati (Quthb, 2002).

