

BAB II

KAJIAN PUSTAKA

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

Manusia merupakan makhluk ciptaan Allah yang diberi akal agar dapat menjaga ciptaan-Nya. Allah menciptakan segala sesuatu dimuka bumi ini adalah untuk kemakmuran umat manusia selain itu Allah juga menjadikan manusia sebagai kholifah untuk memakmurkan bumi sesuai dengan firman Allah dalam QS. al-An'aam (6) ayat 141:

وَهُوَ الَّذِي أَنْشَأَ جَنَّاتٍ مَّعْرُوشَاتٍ وَغَيْرَ مَعْرُوشَاتٍ وَالنَّخْلَ وَالزَّرْعَ مُخْتَلِفًا أُكُلُهُ
وَالزَّيْتُونَ وَالرُّمَانَ مُتَشَابِهًا وَغَيْرَ مُتَشَابِهٍ كُلُوا مِنْ ثَمَرِهِ إِذَا أَثْمَرَ وَآتُوا حَقَّهُ
يَوْمَ حَصَادِهِ وَلَا تُسْرِفُوا إِنَّهُ لَا يُحِبُّ الْمُسْرِفِينَ ﴿١٤١﴾

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

Dalam Tafsir Al-Mishbah ayat tersebut mengandung perintah kepada manusia (langsung atau tidak langsung) untuk membangun bumi dalam kedudukannya sebagai khalifah, salah satunya dengan menjaga kelestarian tumbuh-tumbuhan, sekaligus menjadi alasan mengapa manusia harus menyembah Allah SWT semata. Allah menciptakan segala yang ada di bumi ini sesungguhnya untuk kemakmuran dan kebutuhan umat manusia. Allah

memperbolehkan dan mempersilahkan untuk mengambil manfaat dari apa yang tumbuh di muka bumi ini, akan tetapi Allah menegaskan agar tidak menggunakan secara berlebihan dan mengambil manfaat seperlunya karena Allah tidak menyukai segala sesuatu yang berlebih-lebihan.

Salah satu usaha menjaga kemakmuran dan kelestarian terhadap apa yang telah diciptakan Allah adalah dengan melakukan konservasi terhadap tumbuh-tumbuhan tersebut. Sepertinya halnya dalam penelitian ini dilakukan usaha untuk melestarikan tumbuhan Purwoceng agar tidak punah maka dilakukan melalui teknik kultur jaringan tumbuhan. Melalui kultur jaringan tumbuhan maka dapat dijadikan sebagai usaha konservasi selain itu eksplorasi manfaat (kandungan metabolit sekunder/ kandungan obat) dapat diperoleh secara optimal untuk kehidupan manusia.

Purwoceng merupakan tanaman afrodisiak asli Indonesia. Purwoceng hidup sebagai tanaman liar yang tumbuh di bawah tegakan hutan. Tanaman ini banyak diburu orang termasuk industri jamu dan obat sebagai bahan baku untuk meningkatkan vitalitas pria. Harga herbanya sangat mahal karena keberadaannya termasuk langka. Purwoceng telah banyak dibudidayakan di Dieng, Desa Sikunang Wonosobo. Namun, Purwoceng hanya mampu tumbuh di luar habitatnya yang mempunyai kemiripan dengan habitat asli di Dieng.

Pada awalnya nama latin Purwoceng adalah *Pimpinella pruatjan*, kemudian direvisi menjadi *Pimpinella alpina*. Tumbuhan ini ditemukan di Pegunungan Alpen di Swiss, pada ketinggian 2.000-3.000 meter dpl. Di daerah Sunda, Purwoceng disebut juga antanan gunung. Sementara di daerah

lain dikenal dengan sebutan suripandak abang, gebangan depok, Purwoceng dan rumput dempo (Jawa). Klasifikasi Purwoceng adalah sebagai berikut :

Kingdom Plantae

Divisio Spermatophyta

Class Dicotyledoneae

Ordo Umbelliflorae

Family Apiaceae

Genus *Pimpinella*

Spesies *Pimpinella alpine* Molk.

Purwoceng berupa tanaman herba parenial, berakar tunggang. Akar bagian pangkal semakin lama akan bertambah ukurannya seolah membentuk umbi (Gambar 2.1.2.e) seperti ginseng, tetapi tidak sebesar umbi ginseng. Habitus membentuk rosset dan tangkai daun berada di atas permukaan tanah. Tajuk tanaman menutupi permukaan tanah hampir membentuk bulatan dengan diameter tajuk berkisar 36-45 cm setiap tanaman.



Gambar 2.1.2 Tahapan pertumbuhan tanaman Purwoceng (*Pimpinella alpine* Molk.)
a.tanaman Purwoceng, b. kucup bunga, c.bunga mekar, d.buah, dan e.akar tanaman berumur 6 bulan (Darwati, 2006).

Tangkai daun Purwoceng tumbuh rapat menutupi batang tanaman (Gambar 2.1.2.a). Batang tanaman tidak terlihat seolah tidak ada. Jumlah tangkai berkisar 22-27 buah/tanaman. Pangkal tangkai biasanya berwarna kecoklatan, sebagian kecil saja yang berwarna merah kehijauan. Panjang tangkai daun berkisar 18-26 cm. Daun tanaman majemuk menyirip ganjil. Anak daun tumbuh di sepanjang tangkai daun dengan kedudukan saling berhadapan. Bentuk anak daun membulat dengan pinggir bergerigi. Warna permukaan daun hijau dan permukaan bawah hijau keputihan.

Purwoceng memiliki bunga majemuk membentuk payung (Gambar 2.1.2.c), mempunyai sekitar 4-9 tangkai bunga primer. Setiap tangkai primer rata-rata memiliki 4-5 tangkai sekunder. Sementara setiap tangkai sekunder mempunyai rata-rata 4-10 tangkai tersier dan tangkai tersier mempunyai 8-10 tandan bunga. Setiap tandan bunga yang berbentuk payung terdapat 8-15 bunga yang membentuk biji. Dengan demikian satu tanaman menghasilkan 1.500-2.500 biji. Biji yang telah masak berwarna hitam, ukurannya kecil. Termasuk tanaman berumah satu dan dapat melakukan penyerbukan silang.

2.1.1 Habitat

Purwoceng adalah tanaman endemik asli Indonesia. Di daerah Jawa Tengah terdapat di pegunungan Dieng, sedangkan di Jawa Barat ditemukan banyak tumbuh di Gunung Galunggung dan Gunung Gede Pangrango.

Purwoceng merupakan tanaman daerah dataran tinggi yang tumbuh pada ketinggian 1800-3300 di atas permukaan air laut (dpl). Tanaman tumbuh subur pada ketinggian sekitar 2000 m dpl dengan kondisi tanah yang subur

dan gembur, suhu udara berkisar 60-70%, serta curah hujan diatas 4.000 mm/tahun. Untuk pertumbuhannya, selain memerlukan tanah yang gembur dan subur tetapi juga diperlukan tanah yang kaya organik dengan pH tanah 5,7-6,0. tanaman tidak tumbuh baik pada tanah dengan struktur liat. Untuk tanah yang kurang subur memerlukan pemupukan, terutama pupuk organik.

Populasi tanaman Purwoceng di Indonesia sangat sedikit, sehingga tergolong tanaman yang dikategorikan hampir punah. Semula Purwoceng diperkirakan hanya dapat tumbuh di daerah habitat aslinya di dataran tinggi Dieng. Berdasarkan hasil survei tahun 2003, Purwoceng hanya ditemukan di Dieng, desa Sikunang, Wonosobo (Rahardjo 2005). Beberapa petani membudidayakan dengan skala sangat sempit, disebabkan keterbatasan bibit. Namun kini Purwoceng sudah dapat dikembangkan di daerah lain yang memiliki kemiripan dengan habitat aslinya.

2.1.2 Kandungan dan Manfaat

Penelitian fitokimia banyak dilakukan, Sidik (1975) melaporkan akar Purwoceng mengandung bergapten, isobergapten, dan sphondin (kelompok furanokumarin). Caropeboka (1975), akar Purwoceng mengandung senyawa kumarin, saponin, sterol, alkaloid, dan beberapa macam senyawa gula (oligosakarida). Penelitian Suzery (2004) menunjukkan adanya senyawa stigmasterol pada akar Purwoceng berdasarkan data spektroskopi dengan UV-Vis, FTIR, dan GC-MS. Rostiana (2004) melaporkan pula adanya senyawa kimia yang teridentifikasi secara kualitatif, yaitu bergapten, marmesin, 4-hidroksi kumarin, umbeliferon, dan psoralen.

Purwoceng salah satu tanaman obat tradisional dikenal berkhasiat obat perkasa kaum lelaki. Purwoceng mendapat sebutan sebagai “Viagra Jawa”. Seluruh bagian tanaman Purwoceng dapat digunakan sebagai obat, terutama bagian akar. Akar mempunyai sifat diuretika (melancarkan saluran air seni), sebagai “*aprosidiak*” (meningkatkan gairah seksual dan menimbulkan ereksi) dan tonik (meningkatkan/menambah stamina tubuh). Penelitian menunjukkan tumbuhan afrodisiak mengandung senyawa turunan saponin, alkaloid dan tannin, secara fisiologis dapat melancarkan sirkulasi/peredaran darah pada sistem saraf pusat (serebral) atau sirkulasi darah tepi (perifer).

Hasil riset di balai penelitian tanaman rempah dan obat (Balitro) di Bogor menunjukkan bahwa akar dan daun Purwoceng mengandung steroid (stigmasterol dan sitosterol), turunan kumarin serta vitamin E. Kandungan vitamin E Purwoceng dapat dimanfaatkan sebagai bahan kosmetika untuk peremajaan sel tubuh dan memperbaiki kesuburan wanita. Purwoceng juga bermanfaat sebagai penghangat tubuh, menguatkan otot dan saraf, menghilangkan rasa letih setelah bekerja, serta melancarkan buang air kecil.

Pada umumnya tanaman yang berkhasiat aprodisiak mengandung senyawa-senyawa turunan saponin, alkaloid, tanin, dan senyawa lain yang berkhasiat sebagai penguat tubuh serta memperlancar peredaran darah. Akar Purwoceng juga mengandung turunan senyawa Kumarin yang digunakan dalam industri obat modern, tetapi bukan sebagai aprodisiak, melainkan sebagai anti-bakteri, anti-fungi (anti-jamur), dan anti-kanker. Bahan aktif Purwoceng terbanyak terletak pada bagian akarnya (Bahti, 1983).

2.2 Pertumbuhan Secara Kultur *In Vitro*

Pertumbuhan menunjukkan suatu proses perubahan secara kuantitatif berupa penambahan jumlah sel, ukuran panjang, lebar serta berat dari organisme. Tumbuhan mengalami pertumbuhan karena sel-selnya bertambah banyak atau mengalami pertambahan panjang karena ada perubahan volume serta berat basah atau kering (perubahan secara kuantitatif) (Lukiati, 2001).

Kultur jaringan/*Cultur in vitro* adalah istilah umum yang ditujukan pada budidaya secara *in vitro* terhadap berbagai bagian tanaman seperti batang, daun, akar, bunga, kalus, sel, protoplas dan embrio. Bagian-bagian tersebut yang diistilahkan sebagai eksplan, diisolasi dari kondisi *in vivo* dan dikultur pada medium buatan yang steril sehingga dapat beregenerasi dan berdeferensiasi menjadi tanaman lengkap (Zulkarnain, 2009). Hartman (1990) menggunakan istilah yang lebih spesifik, yaitu mikropropagasi terhadap pemanfaatan teknik kultur jaringan dalam upaya perbanyakan tanaman, dimulai dari pengkulturan bagian tanaman yang sangat kecil (eksplan) secara aseptik di dalam tabung kultur atau wadah lain yang serupa.

2.2.1 Prinsip Kultur *In Vitro*

Ada beberapa prinsip dasar yang harus diperhatikan dalam melaksanakan teknik kultur jaringan yaitu :

- a. Mengetahui teori totipotensi sel yang dikemukakan oleh Schleiden dan Schwann yaitu sel mempunyai kemampuan *autonom* dan totipotensial.
- b. Memahami konsep Skoog dan Miller, regenerasi tunas dan akar *in vitro* dikontrol secara hormonal oleh ZPT sitokinin dan auksin. *Organogenesis*

adalah proses terbentuknya organ baik secara langsung dari permukaan eksplan atau tidak langsung melalui pembentukan kalus terlebih dahulu.

- c. Memahami sifat kompeten, diferensiasi dan determinasi dimana suatu sel akan dikatakan kompeten apabila sel atau jaringan tersebut mampu memberikan tanggapan terhadap signal lingkungan atau signal hormonal.
- d. Memahami tata cara perbanyakan tanaman secara kultur jaringan.

2.2.2 Teknik Kultur *In Vitro*

Teknik kultur meliputi pemilihan dan penyiapan tanaman sumber eksplan, inisiasi kultur, persiapan media, isolasi bahan tanam (eksplan), sterilisasi eksplan, inokulasi eksplan, aklimatisasi dan usaha pemindahan tanaman hasil kultur ke lapang. Kultur *in vitro* memiliki beberapa keuntungan dibandingkan teknik lain, seperti bibit yang diperoleh seragam dalam jumlah besar dan memiliki sifat yang sama dengan induknya (Yusnita, 2007).

Teknik kultur akan berhasil dengan baik bila syarat yang diperlukan telah terpenuhi. Syarat-syarat tersebut meliputi pemilihan eksplan sebagai bahan dasar untuk pembentukan kalus, penggunaan medium yang sesuai, keadaan yang aseptik dan pengaturan udara yang baik. Menurut Hendaryono dan Wijayani (1994) terdapat beberapa teknik kultur tanaman yaitu:

1. Kultur meristem yaitu budidaya menggunakan eksplan jaringan yang muda.
2. Kultur anthera yaitu budidaya jaringan dengan menggunakan serbuk sari.
3. Kultur embrio yaitu memisahkan embrio tanaman yang belum dewasa dan menumbuhkannya secara kultur untuk mendapatkan tanaman yang viable.
4. Kultur protoplasma yaitu budidaya menggunakan eksplan protoplasma.

2.2.3 Faktor Yang Mempengaruhi Keberhasilan Kultur *In Vitro*

Menurut Santoso dan Nursandi (2004) ada beberapa faktor yang dapat mempengaruhi keberhasilan kultur jaringan yaitu:

1. Genotif

Pada beberapa jenis tumbuhan, embrio mudah tumbuh akan tetapi pada tumbuhan lain sukar tumbuh, disebabkan perbedaan kultivar dari jaringan.

2. Eksplan

Eksplan berupa sel, jaringan atau organ yang digunakan sebagai bahan inokulum dan ditanam dalam media kultur. Bagian yang digunakan sebagai eksplan adalah sel yang aktif membelah, dari tanaman induk sehat dan berkualitas tinggi. Ukuran eksplan kecil ketahanan eksplan kurang baik dan bila eksplan terlalu besar, akan mudah terkontaminasi.

3. Komposisi media

Media sebagai sumber makanan harus mengandung senyawa organik dan anorganik, seperti nutrient makro dan mikro dalam kadar dan perbandingan tertentu, gula, air, asam amino, vitamin dan zpt. Faktor lain yang tidak boleh diabaikan adalah ion ammonium dan potassium.

4. Oksigen

Suplai oksigen yang cukup sangat menentukan laju multiplikasi tunas dalam usaha perbanyakkan secara *in vitro*.

5. Cahaya

Intensitas cahaya yang rendah dapat mempertinggi embriogenesis dan organogenesis. Intensitas cahaya optimum pada kultur 0-1000 lux (inisiasi),

1000-10000 (multiplikasi), 10000-30000 (pengakaran) dan <30000 untuk aklimatisasi. Perkembangan embrio membutuhkan tempat gelap 7-14 hari, kemudian dipindah ke tempat terang untuk pembentukan klorofil.

6. Temperatur

Temperatur yang umum digunakan untuk kultur berbagai tanaman adalah $\pm 20^{\circ}\text{C}$. Suhu terlalu rendah dapat menghambat pertumbuhan tanaman dan suhu terlalu tinggi dapat membuat tanaman merana. Temperatur optimum tergantung jenis tumbuhan, temperatur normal antara $22-28^{\circ}\text{C}$.

7. pH

pH (Keasaman) dimana sel-sel yang dikembangkan dengan kultur jaringan memiliki toleransi pH yang relatif sempit dan tidak normal antara 5-6. Apabila eksplan sudah tumbuh biasanya pH media umumnya akan naik.

8. Lingkungan yang aseptik

Kondisi lingkungan sangat menentukan terhadap tingkat keberhasilan pembiakan tanaman dengan kultur jaringan.

2.2.4 Masalah dalam Kultur *In Vitro*

Pada kegiatan kultur jaringan, tidak sedikit masalah dapat terjadi sebagai penyebab kegagalan. Masalah yang biasa timbul dalam kegiatan kultur jaringan antara lain adalah:

a) Kontaminasi

Kontaminasi adalah gangguan yang sering terjadi pada kultur. Kontaminasi dapat dilihat dari jenis kontaminan seperti bakteri, jamur, virus.

Selain itu dapat berdasarkan waktunya yaitu hitungan jam, hitungan hari dan minggu, serta berdasarkan sumber kontaminasi dari media atau eksplan.

b) *Browning*

Browning/pencoklatan adalah karakter yang dapat menghambat pertumbuhan dan perkembangan eksplan. Menyebabkan perubahan warna eksplan (hitam/cokelat). Terjadi perubahan aditif eksplan disebabkan pengaruh fisik maupun biokimia (memar, luka, atau serangan penyakit).

c) *Vitrifikasi*

Vitrifikasi umumnya terjadi akibat kegagalan pada proses pembentukan daging sel dan hambatan pada proses pembentukan lignin. Hal ini dapat diatasi dengan cara menaikkan sukrosa, menambah pektin, memindahkan eksplan pada suhu 40°C selama 15 hari.

d) *Pemeliharaan*

Kendala yang sering ditemukan sebagai penghambat antara lain, adanya mutasi pada bibit yang dihasilkan sehingga berbeda dengan induknya, keberhasilan induksi perakaran dari tunas yang telah dibentuk secara *in vitro* sedikit, aklimatisasi sering gagal, tingkat keanekaragamannya disetiap generasi turun terutama apabila sering dilakukan subkultur (Mariska, 2003).

2.3 Media Kultur *In Vitro*

Media kultur jaringan pada awalnya memiliki komposisi yang didasarkan pada bahan yang digunakan untuk kegiatan *hydroponic* yang berkembang sebelumnya. Biasanya dalam kultur jaringan unsur hara diberikan

dalam bentuk garam organik. Pada perkembangan selanjutnya para peneliti mulai menambahkan vitamin, senyawa kompleks dan zpt (Santoso, 2004).

Menurut Hendaryono dan Wijayati (1994) dalam kultur jaringan ada beberapa jenis media yang umum digunakan yaitu:

1. Medium dasar B5/Gamborg untuk kultur suspensi sel kedelai dan alfafa
2. Medium dasar White biasanya digunakan untuk kultur akar, merupakan medium dasar dengan konsentrasi garam mineral yang sangat rendah
3. Medium VW biasanya digunakan khusus untuk media anggrek
4. Media WPM biasanya digunakan untuk tanaman berkayu
5. Media MS adalah media yang paling umum dan banyak digunakan

2.3.1 Kandungan Media Kultur *In Vitro*

Media merupakan salah satu faktor yang menentukan keberhasilan kultur. Media kultur harus mengandung komponen yang diperlukan untuk pertumbuhan eksplan. Adapun komposisi media kultur adalah sebagai berikut:

1) Air

Air merupakan komponen penting dalam kultur karena 95% dari medium mengandung air. Untuk tujuan penelitian dengan eksplan protoplas, meristem dan sel sebaiknya digunakan aquabides (destilasi) (Welsh 1991). Air destilasi steril dari kontaminasi mikroorganisme.

2) Larutan Garam Anorganik

Tanaman memerlukan setidaknya 6 elemen makronutrien, yaitu unsur yang diperlukan dalam jumlah besar meliputi N, K, Mg, Ca, S, P dan 7 elemen mikronutrien, yaitu unsur yang diperlukan dalam jumlah

kecil meliputi Fe, Mn, B, Mo, Cl (Wetherell, 1976). Unsur makro biasanya diberikan dalam bentuk NH_4NO_3 , KNO_3 , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dan KH_2PO_4 , sedangkan unsur mikro diberikan dalam bentuk $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, H_3BO_3 , KI , $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dan $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Pereduksi yang berfungsi mereduksi indikator seperti ion Cu^{2+} menjadi bentuk kupro (Cu^+) bermanfaat pada perkembangan.

Vitamin adalah bahan yang perlu ditambahkan dalam medium kultur *in vitro*, sebab sel bagian tanaman yang dikulturkan secara *in vitro* belum mampu membuat vitamin sendiri untuk kehidupannya (Katuuk, 1989). Vitamin yang sering ditambahkan ke dalam medium adalah tiamin (vitamin B₁), asam nikotinat (niasin), piridoksin (vitamin B₆).

3) Zat-zat organik

Senyawa kimia organik yang biasa dipakai sebagai sumber energi dalam kultur adalah karbohidrat. Karbohidrat tersusun atas unsur C, H, O sebagai elemen penyusun utama. Bahan organik termasuk karbohidrat meliputi gula, pati dan selulosa. Karbohidrat mempunyai fungsi sebagai sumber energi untuk jaringan dan keseimbangan tekanan osmotik medium.

Secara umum konsentrasi optimum sukrosa adalah 2-3%. Kadar sukrosa yang digunakan sebagai sumber energi untuk menginduksi pertumbuhan eksplan adalah 2-7%. Katuuk (1989), menyatakan sukrosa bersifat labil terhadap suhu tinggi sehingga bila disterilkan dalam autoklaf dengan zat lain mengakibatkan penguraian sukrosa menjadi kombinasi

sukrosa, D-glukosa, dan D-fruktosa. Keuntungan penguraian ini adalah terbentuknya aldosa (D-glukosa) dan ketosa (D-fruktosa) yang melimpah.

2.3.2 Media MS

Media MS (Murashige dan Skoog) adalah media yang umum dan paling banyak digunakan dalam kultur jaringan terutama untuk jenis tanaman herbaceous. Media MS adalah perbaikan dari media Skoog pada komposisi garam anorganiknya. Media MS memiliki kandungan N lebih tinggi baik bentuk nitrit maupun nitrat dibandingkan media lainnya (Gunawan 1992).

Media MS mengandung 40 mM N dalam bentuk NO_3 dan 29 mM N dalam bentuk NH^{4+} . Kandungan N ini, lima kali lebih tinggi dari N total yang terdapat pada media Miller, 15 kali lebih tinggi dari media tembakau Hildebrant, dan 19 kali lebih tinggi dari media White. Kalium juga ditingkatkan sampai 20 mM, sedangkan P, 1.25 mM. Awalnya unsur makro media MS dibuat untuk kultur kalus tembakau, tetapi komposisi MS ini sudah umum digunakan untuk kultur jaringan jenis tanaman lain (Erwin, 2009).

Media MS merupakan media yang memiliki kandungan unsur hara lengkap diperkaya oleh vitamin dan hormon. Umumnya digunakan untuk berbagai tujuan kultur, sehingga dikembangkan media berdasarkan media MS, antara lain media Lin & Staba, menggunakan $\frac{1}{2}$ komposisi unsur makro MS, dan modifikasi 9mM ammonium nitrat yang seharusnya 10mM, sedangkan KH_2PO_4 dikurangi menjadi 0.5mM, tidak 0.625 mM. Namun untuk berbagai jenis tanaman biasanya media ini tetap digunakan sebagai media dasar yang berbeda adalah kombinasi maupun konsentrasi dari media tersebut.

2.4 Zat Pengatur Tumbuh (ZPT)

Zat pengatur tumbuh dibuat untuk memacu pembentukan fitohormon (hormon tumbuhan) yang sudah ada di dalam tanaman atau menggantikan peran hormon bila tanaman tidak memproduksi hormon dengan baik. Hormon berasal dari bahasa Yunani yaitu hormaein yang mempunyai arti merangsang atau mendorong timbulnya suatu aktivitas biokimia. Fitohormon dapat didefinisikan sebagai senyawa organik yang bekerja aktif dalam jumlah sedikit, ditransportasikan ke seluruh bagian tanaman sehingga dapat mempengaruhi pertumbuhan atau proses fisiologi tanaman (Sumiasri, 2006).

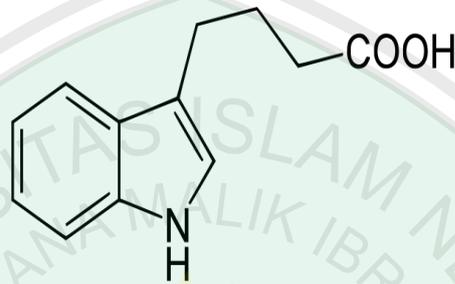
Konsep ZPT diawali dengan konsep hormon tanaman, Proses fisiologi diantaranya seperti pembukaan stomata, translokasi serta penyerapan hara. ZPT dibutuhkan sebagai komponen media bagi pertumbuhan dan diferensiasi. Tanpa penambahan ZPT dalam medium biasanya pertumbuhan tanaman akan lambat. Pembentukan kalus dan organ tanaman ditentukan oleh penggunaan yang tepat dari ZPT tersebut (Santoso dan Nursandi, 2004).

2.4.1 ZPT IBA

1H-Indole-3-asam butanoic (IBA) adalah padatan kristal putih bercahaya kuning, dengan rumus molekul $C_{12}H_{13}NO_2$ (Gambar 2.4.1). Senyawa ini dapat meleleh dengan suhu $125^{\circ}C$ pada tekanan atmosfer dan terurai sebelum direbus. IBA adalah hormon jenis auksin dan merupakan bahan produk perakaran tanaman hortikultura komersial (William, 1999).

IBA adalah hormon yang tidak larut dalam air, biasanya dilarutkan dalam 75% atau lebih alkohol murni untuk digunakan proses perakaran, dibuat

larutan antara 10.000 sampai 50.000 ppm. Larutan alkohol ini kemudian diencerkan menggunakan air suling dengan konsentrasi yang diinginkan. IBA juga tersedia sebagai garam yang larut dalam air. Larutan harus disimpan di tempat yang sejuk dan gelap untuk hasil terbaik (Hartmann, 1990).



Gambar 2.4.1. Struktur Kimia zpt IBA

IBA merupakan hormon yang bersifat aktif, walaupun cepat dimetabolismekan menjadi IBA-aspartat dan dapat menjadi konjugat dengan peptida yang lain. Terbentuknya konjugat tersebut dapat menyimpan IBA yang kemudian dilepaskan secara bertahap. Hal tersebut menjadikan konsentrasi IBA bertahan pada tingkat yang tepat (Salisbury, 1995).

Indole Butyric Acid (IBA) memiliki sifat kimia dan mobilitas lebih stabil di dalam tanaman, selain itu daya kerjanya lebih lama. Sifat IBA inilah yang menyebabkan pemakaiannya lebih berhasil. ZPT ini tetap berada di tempat ZPT tersebut diberikan dan tidak menyebar ke bagian tanaman lain sehingga tidak mempengaruhi pertumbuhan bagian lain (Sulastri, 2003). Pemakaian IBA biasanya digunakan dalam jumlah kecil dan dalam waktu yang singkat, antara 2–4 minggu karena merupakan auksin kuat, artinya auksin ini tidak dapat diuraikan di dalam tubuh tanaman (Hendaryono, 1994). Sebab pada suatu dosis tertentu asam IBA sanggup membuat mutasi-mutasi

(Suryowinoto, 1996). Menurut Wattimena (1988) asam IBA mempunyai sifat fitotoksisitas yang tinggi sehingga dapat bersifat herbisida.

Konsentrasi IBA yang diperlukan oleh setiap tanaman berbeda-beda. Cara pemberian hormon dapat dilakukan dengan cara pemberian dengan perendaman, pencelupan dan tepung. Untuk metode perendaman, konsentrasi zat pengatur tumbuh bervariasi antara 20 ppm sampai 200 ppm tergantung kemampuan jenis tanaman. ZPT seperti IBA, NAA dan IAA biasanya digunakan dengan konsentrasi yang sangat rendah pada media tanam yaitu 0.01-10 mg/l. Untuk percobaan eksplorasi, biasanya konsentrasi yang digunakan 0.01mg/l, 0.1mg/l dan 1mg/l dan 10mg/l (Hartmann, 2002).

Auksin digunakan secara luas dalam kultur jaringan untuk merangsang kalus, suspensi sel dan organ. Golongan auksin yang sering ditambahkan dalam medium adalah 2,4-D (2,4-Dikloro fenoksiasetat), IAA (Indol Asam Asetat), NAA (Naftalen Asam Asetat) dan IBA (Indol Buterik Asetat).

2.4.2 Kajian Riset IBA sebagai ZPT pada Media Kultur *In Vitro*

IBA banyak digunakan untuk memicu pertumbuhan tanaman khususnya pada perakaran, baik digunakan secara langsung ataupun dengan metode tertentu. Hasil beberapa penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi IBA yang digunakan beragam sesuai dengan jenis tanamannya. Penelitian Sumiasri (2006) pada biji tanaman Eboni menggunakan IBA dengan konsentrasi 1-2mg/l diperoleh hasil bahwa konsentrasi yang dapat memicu perkecambahan biji Eboni adalah konsentrasi 2mg/l. Pada penelitian Roostika (2007) IBA digunakan untuk regenerasi tanaman Purwoceng melalui kultur

embrio somatik, dari penelitian tersebut konsentrasi IBA yang paling tepat yaitu 1.5mg/l dengan media DKW.

Penelitian kultur *in vitro* Purwoceng oleh Mariska (1990) melaporkan bahwa Purwoceng cukup sulit untuk dimanipulasi (pertumbuhan di luar habitat) secara *in vitro*. Upaya induksi perakaran kultur Purwoceng pernah dilakukan oleh Hening (1991), hasil penelitian menunjukkan pengenceran media dasar ($\frac{1}{2}$ MS) yang dikombinasikan dengan penambahan IBA 5 mg/l dapat menginduksi perakaran, namun akar yang terbentuk abnormal sehingga planlet tidak dapat diaklimatisasi. Dalam hal ini diduga kondisi lingkungan pada saat aklimatisasi tidak cocok bagi pertumbuhan planlet Purwoceng, sehingga perlu dilakukan studi optimasi kondisi lingkungan terlebih dahulu.

Pada penelitian Mariska (1995) melaporkan bahwa formulasi media dasar sangat mempengaruhi pertumbuhan kultur Purwoceng. Tingkat multiplikasi tunas tertinggi yang mencapai 4,25 tunas per eksplan diperoleh dari perlakuan media dasar MS, namun tingkat kelayuan daun terendah diperoleh dari media dasar DKW jumlah daun layu rata-rata 0,46 helai pada umur 14 minggu. Perakaran gagal diinduksi walaupun digunakan pengenceran media dasar MS ($\frac{3}{4}$ MS) dengan penambahan sukrosa 4% dan IBA 5 mg/l. Kegagalan induksi perakaran menyebabkan kegagalan aklimatisasi tanaman.

Hasil penelitian mengindikasikan faktor lingkungan mempengaruhi pertumbuhan kalus, selain formulasi media dasar dan kombinasi ZPT. Hal itu didukung fakta yang menunjukkan secara alamiah Purwoceng tumbuh di dataran tinggi dengan suhu rendah. Perbedaan kondisi lingkungan/inkubasi

kultur dengan habitatnya terutama suhu, menyebabkan tidak tumbuh optimal karena banyak energi digunakan untuk adaptasi daripada pertumbuhan.

2.5 Kultur Kalus

Ke-Esaan dan kebesaran Allah tidak ada yang dapat menandingi di muka bumi ini. Allah menciptakan tumbuhan dengan berbagai jenis dapat dimanfaatkan seperti firman-Nya dalam QS. at-Thaha (20) ayat 53 bahwa :

الَّذِي جَعَلَ لَكُمُ الْأَرْضَ مَهْدًا وَسَلَكَ لَكُمْ فِيهَا سُبُلًا وَأَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَخْرَجْنَا بِهِ أَزْوَاجًا مِّن نَّبَاتٍ شَتَّى ﴿٥٣﴾

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

Ayat di atas menjelaskan bahwasanya Allah telah menciptakan berbagai jenis tanaman. Dari segala jenis tanaman tersebut Allah telah menciptakan pasangan-pasangan bagi tumbuhan agar dapat menghasilkan individu baru atau agar dapat berkembangbiak. Tumbuhan terdiri dari berbagai macam sel-sel yang membentuk suatu jaringan yang memiliki fungsi yang berbeda-beda. Jaringan-jaringan penyusun tumbuhan tersebut saling mendukung dalam menjalankan fungsinya. Dalam teknik kultur jaringan tanaman yang ditanam awalnya hanya sebuah sel yang belum terdiferensiasi. Sel tersebut kemudian ditanam dan kemudian membentuk kalus kemudian menjadi sel yang telah terdiferensiasi menjadi jaringan kemudian organ yang memiliki bermacam-macam fungsi kemudian menghasilkan individu baru.

Eksplan yang ditanam dalam media tersebut dapat tumbuh dan berkembang menjadi tanaman lengkap walaupun awalnya hanya berasal dari sebagian tanaman saja. Ayat tersebut menunjukkan kepada kesempurnaan, kekuasaan, keindahan dan kebijaksanaan Allah. Dia mengeluarkan tumbuh-tumbuhan yang tidak berbatang atau yang berbatang, sedang ia makan dan tumbuh, yakni tidak makan dan tidak tumbuh, seperti tanah, biji, benih dll.

Kalus adalah suatu kumpulan sel amorphous yang terjadi dari sel-sel jaringan yang berproliferasi secara terus menerus dan tidak terorganisasi sehingga memberikan penampilan massa sel yang bentuknya tidak teratur atau belum terdiferensiasi. Proliferasi jaringan ini dapat dilakukan secara tidak terbatas dengan cara melakukan subkultur sepotong kecil jaringan kalus pada medium yang segar dengan interval waktu yang teratur (Sudarmadji, 2003).

Kalus dihasilkan dari lapisan luar sel korteks pada eksplan melalui pembelahan sel secara berulang. Kultur kalus berkembang lebih lambat dibanding kultur yang berasal dari suspensi sel. Kalus terbentuk melalui tiga tahapan yaitu induksi, pembelahan sel, dan diferensiasi. Eksplan yang berasal dari jaringan meristem berkembang lebih cepat dibandingkan dari sel berdinding tipis dan mengandung lignin. Untuk memelihara kalus, maka perlu dilakukan subkultur secara berkala, misalnya setiap 30 hari. Warna kalus (Gambar 2.5) bermacam-macam tergantung sumber eksplan, seperti warna kekuningan, putih, hijau, atau kuning jingga (Aisyah, 2007).



Gambar 2.5 Tekstur kalus (remah dan kompak)

Kultur kalus mensyaratkan eksplan yang ditanam harus diberi pelukaan (*wounding*), dengan tujuan mendefinisikan kembali jaringan dewasa/menjadikan jaringan bersifat meristemoid setelah jaringan tersebut dewasa. Jika sepotong daun dilukai maka pada umur kultur tertentu akan tumbuh benjolan kecil berwarna putih dinamakan kalus (Darwati, 2007).

Agar kalus dapat dijaga pertumbuhannya dan diperbanyak secara berkesinambungan, maka perlu dipindahkan secara teratur pada media baru dalam jangka waktu tertentu (*subkultur*). Apabila kalus disubkultur pada media dilakukan secara regular, maka akan menunjukkan fase pertumbuhan kurva sigmoid. Phillips (1995) membagi lima fase pertumbuhan kalus, yaitu:

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

Dalam waktu 2-4 minggu eksplan yang ditanam (tergantung spesiesnya), akan terbentuk massa kalus yaitu massa amorf tersusun atas sel

parenkim berdinding tipis, berkembang dari hasil proliferasi jaringan induk. Kalus disubkultur dengan mengambil sebagian kalus dan memindahkannya pada medium baru. Dengan sistem induksi yang tepat, kalus dapat berkembang menjadi tanaman yang utuh (plantlet) (Darwati, 2007).

Pada teknik kultur, kalus dapat diinduksi dengan menambahkan ZPT pada media kultur, misalnya auksin dan sitokinin. Jika konsentrasi auksin lebih besar daripada sitokinin maka kalus akan terbentuk, sedangkan jika konsentrasi sitokinin lebih besar dibandingkan auksin maka yang terbentuk bukan kalus, melainkan tunas. Selain ZPT, penambahan vitamin dan protein diperlukan untuk pertumbuhan kalus. Induksi kalus dalam teknik kultur jaringan diperlukan untuk memunculkan keragaman sel somatik dan meregenerasikan sel tersebut menjadi embrio somatik (Roostika, 2006).

Tujuan utama kultur adalah produksi metabolit sekunder, tetapi sel dalam kultur kalus juga masih mempunyai kemampuan diferensiasi menjadi organ tanaman. Sehingga hal ini harus dihindari dengan cara sel pada umur tertentu perlu dibuat immobil atau dikenal dengan istilah immobilisasi sel. Semua sel yang telah diikat ini akan dapat dikulturkan lagi pada saat dibutuhkan. Kultur kalus bermanfaat untuk mempelajari beberapa aspek dalam metabolisme tumbuhan dan diferensiasinya, misalnya (Aisyah, 2007):

1. Mempelajari aspek nutrisi tanaman.
2. Untuk menghasilkan varian somaklonal (genetik atau epigenetik).
3. Untuk produksi metabolit sekunder dan regulasinya.
4. Digunakan untuk seleksi *in-vitro*.

2.6 Metabolit Sekunder

Metabolisme didefinisikan sebagai serangkaian proses transformasi enzimatik molekul organik dalam sel (Herbert, 1995). Molekul organik dapat berupa protein, karbohidrat, asam nukleat, dan lemak. Proses metabolisme dapat dibedakan menjadi dua golongan yaitu metabolit primer dan sekunder.

Polisakarida, protein, lemak, dan asam nukleat merupakan penyusun utama makhluk hidup, karena itu disebut metabolit primer. Metabolisme primer pada tumbuhan, seperti respirasi dan fotosintesis, merupakan proses esensial bagi kehidupan tumbuhan. Tanpa metabolisme primer, pertumbuhan, perkembangan, serta reproduksi tanaman akan terganggu. Berbeda dengan metabolisme primer, metabolisme sekunder merupakan proses yang tidak esensial bagi kehidupan organisme. Hilang/ tidak adanya metabolit sekunder tidak menyebabkan kematian secara langsung bagi tumbuhan, tapi dapat menyebabkan berkurangnya ketahanan hidup tumbuhan secara tidak langsung.

Metabolit sekunder memiliki karakter khusus pada setiap makhluk hidup dan dibentuk melalui jalur khusus dari metabolit primer. Metabolit sekunder berguna untuk meningkatkan pertahanan diri (Herbert, 1995), dan merupakan sumber senyawa yang mempunyai aktivasi farmatikal (Rao, 2002). Senyawa ini tidak berpengaruh langsung terhadap pertumbuhan dan perkembangan tumbuhan itu sendiri.

Menurut Herbert (1995) ada enam sifat khas metabolit sekunder yaitu 1) spesifik untuk satu atau beberapa spesies, 2) tidak diperlukan untuk pertumbuhan sel, 3) produksinya sangat dipengaruhi oleh faktor lingkungan,

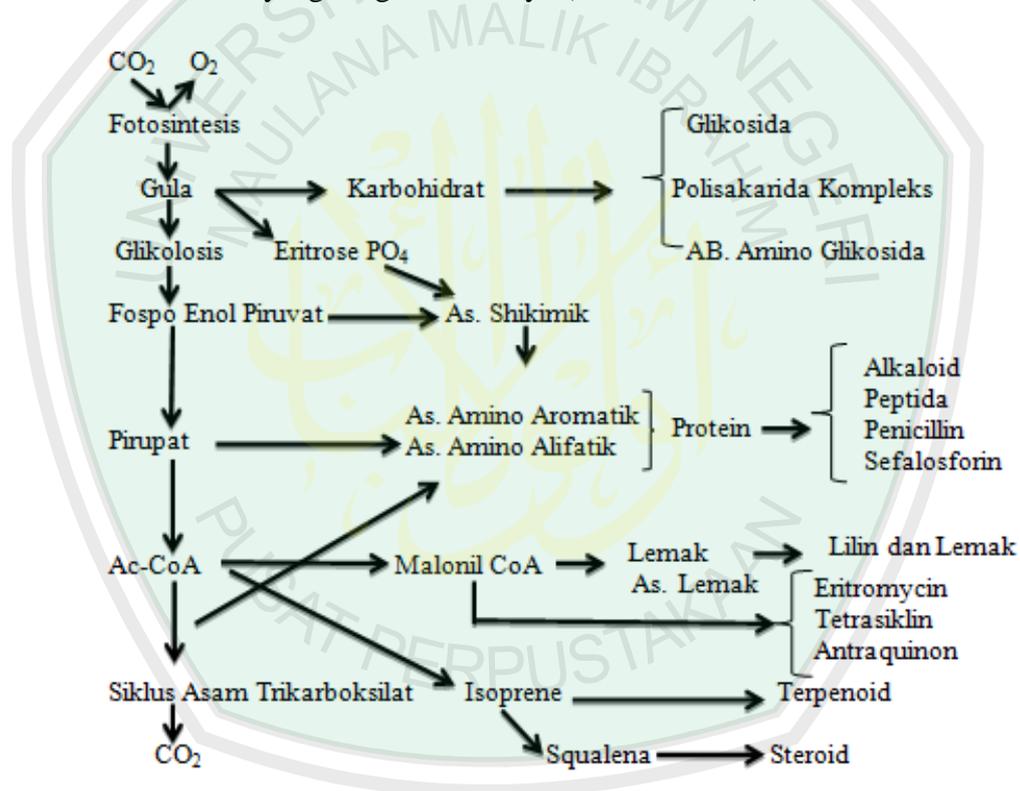
4) beberapa diproduksi dengan kemiripan struktur, 5) biosintesisnya dikendalikan oleh mekanisme yang berbeda dengan metabolit primer, 6) metabolit sekunder biasanya dihasilkan secara ekstraseluler.

Senyawa metabolit sekunder tidak berperan dalam mengarahkan fotosintesis, respirasi, translokasi, sintesis protein, pembentukan karbohidrat, protein dan lemak (Taiz dan Zeigler, 2002). Sebagian ahli mengatakan metabolit sekunder mempunyai peran ekologis dalam tubuh tumbuhan yaitu:

- a. Melindungi dari serangan herbivora dan infeksi oleh mikroba patogen.
- b. Sebagai pollinator benih yang penyerbukannya dibantu oleh binatang.
- c. Senyawa metabolit sekunder dapat juga berfungsi sebagai nutrisi darurat untuk mempertahankan hidup.
- d. Sintesis metabolit sekunder merupakan salah satu fungsi protektif tanaman ketika ada beberapa patogen dengan meningkatkan fitoaleksin.

Metabolit sekunder pada tanaman berdasarkan sumber atau cara produksi terdiri dari dua macam yaitu metabolit sekunder yang bersifat fitoaleksin dan indogenus. Fitoaleksin merupakan sebutan umum untuk senyawa fenolik yang disintesis dan diakumulasi tanaman inang mengikuti interaksi tanaman inang dengan pathogen dan bersifat antifungal. Sintesis fitoaleksin ini dirangsang oleh adanya elisitor yang menginduksi enzim yang terlibat dalam siklus metabolisme pembentukan fitoaleksin tersebut. Metabolit sekunder yang bersifat fitoaleksin merupakan hasil metabolit sekunder yang diinduksi oleh tanaman karena adanya pengaruh dari lingkungan seperti adanya patogen, sumber nutrisi habis, infeksi oleh mikroba dan sebagainya.

Metabolit sekunder dibedakan menjadi 3 golongan berdasarkan kimiawinya, satu diantaranya yaitu senyawa fenol. Tumbuhan memproduksi banyak variasi dari metabolit sekunder yang termasuk golongan fenol suatu kelompok hidroksil yang berfungsi pada cincin aromatik. Senyawa fenol membantu tanaman dalam melawan serangan herbivora dan patogen. Selain itu senyawa fenol mampu menarik serangga penyerbuk dan menyerap radiasi sinar ultraviolet yang sangat berbahaya (Herbert, 1995).



Gambar 2.6 Bagan Pembentukan Metabolit Primer Menjadi Metabolit Sekunder (Sastrohamidjojo, 1996)

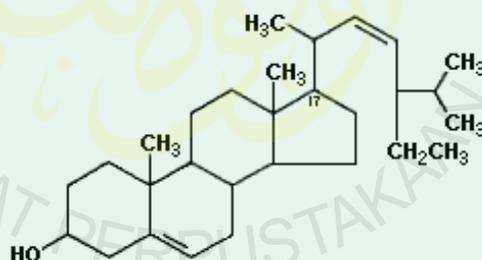
Jalur metabolisme primer biasanya merupakan jalur umum yang terdapat pada semua organisme, sedangkan jalur metabolisme sekunder merupakan jalur khusus untuk masing-masing spesies. Sistem regulasi biosintesis metabolit sekunder berbeda nyata dengan regulasi metabolit primer

dan tergantung pada kondisi lingkungan. Hal ini biasanya ditunjang oleh kondisi pertumbuhan yang sub optimal serta ditekan oleh fosfat organik juga oleh sumber karbon dan nitrogen yang cenderung lebih menunjang pada pertumbuhan vegetatif daripada diferensiasi morfologi (Dalimonthe, 1987).

Metabolit sekunder berasal dari senyawa antara maupun produk metabolisme primer, sehingga banyak jalur sebagai penghubung antara jalur metabolisme primer dan metabolisme sekunder.

2.6.1 Senyawa Stigmasterol

Stigmasterol adalah salah satu dari kelompok sterol atau pitosterol. Stigmasterol (Gambar 2.6.2) merupakan senyawa turunan asam lemak yang terdapat hampir pada semua tumbuhan. Biasanya stigmasterol, dijumpai berupa campuran dengan β -sitosterol dan kampresterol (Cheng, 2002).



Gambar 2.6.1 Struktur kimia Senyawa Stigmasterol (Cheng, 2002)

Stigmasterol digunakan sebagai prekursor dalam pembuatan sintesis progesteron, yang berperan penting dalam mekanisme fisiologis dan jaringan yang berhubungan dengan estrogen, serta bertindak sebagai perantara dalam biosintesis androgen, estrogen, dan corticoids, slain itu juga digunakan sebagai prekursor vitamin D.

Kadar stigmasterol dari tanaman Purwoceng yang ditanam dilapang berkisar antara 0,082%-0,126%, kadar stigmasterol tertinggi adalah tanaman yang tumbuh dan diberi dengan pupuk. Menurut Rahardjo dan Rostiana (2006), pemberian pupuk kandang mampu meningkatkan produk simplisia Purwoceng sebanyak 40%, kadar stigmasterol pada akar Purwoceng meningkat 10 kali dibanding tanaman Purwoceng yang tidak dipupuk. Menurut Rahardjo (2006), tanaman yang lebih subur akan menghasilkan metabolit sekunder lebih banyak, karena produk metabolit primernya tinggi.

Stigmasterol diekstraksi dari Purwoceng melalui metode sokhletasi menggunakan pelarut etanol. Analisis KLT menunjukkan keberadaan stigmasterol pada tanaman Purwoceng. Berdasarkan analisis KG, diperoleh data kadar stigmasterol dari daun Purwoceng kering sebesar 0,1595% untuk Purwoceng yang tumbuh pada ketinggian 1900 m dpl dan 0,0378% untuk Purwoceng yang tumbuh pada ketinggian 1200 m dpl (Ulya, 2008).

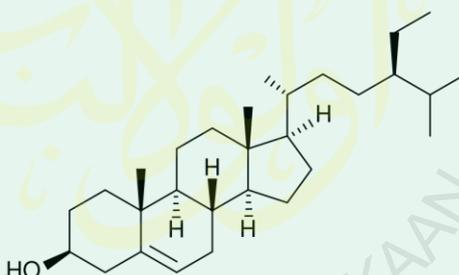
2.6.2 Senyawa Sitosterol

Beta-sitosterol adalah zat yang ditemukan pada tumbuhan. Bahan ini ditemukan dalam buah-buahan, sayuran, kacang-kacangan, dan biji yang digunakan dalam pembuatan obat. β -sitosterol adalah salah satu dari beberapa pitosterol (sterol) dengan struktur kimia mirip dengan kolesterol (Gambar 2.6.3). Sitosterol berwarna putih, bubuk seperti malam dengan bau yang khas. Mereka adalah hidrofobik dan larut dalam alkohol.

β -sitosterol digunakan untuk penyakit jantung dan kolesterol tinggi (menghambat penyerapan kolesterol di usus). Selain itu juga digunakan untuk

meningkatkan sistem kekebalan tubuh dan mencegah kanker usus besar, batu empedu, flu (influenza), HIV/AIDS, rheumatoid arthritis, TBC, psoriasis, alergi, kanker serviks, fibromyalgia, sistemik lupus eritematosus (SLE), asma, rambut rontok, bronkitis, sakit kepala, mengurangi kadar kolesterol darah dan terkadang digunakan mengobati hiperkolesterolemia.

Pada penelitian Syahid (2010) kadar β -sitosterol Purwoceng berkisar antara 0,11-0,21% dan kadar β -sitosterol tertinggi pada perlakuan penanaman dengan pemberian pupuk kandang sapi yakni sebesar 0,21%. Kadar β -sitosterol terendah pada perlakuan dosis pupuk kandang sapi 0 ton/ha + tanpa mikoriza. Kadar sitosterol pada tanaman meningkat dengan perlakuan pemupukan dibandingkan dengan tanaman yang tidak dipupuk.



Gambar 2.6.2 Struktur Senyawa sitosterol (Cheng, 2002)

2.6.3 Biosintesis Stigmasterol dan Sitosterol

Pada masa generatif, metabolisme metabolit sekunder memuncak pada tanaman sehingga kandungan zat aktif dalam kondisi tinggi. Metabolit sekunder inilah yang mempunyai khasiat obat (Rahardjo, 2003). Biosintesis senyawa stigmasterol dan sitosterol pada tanaman berasal dari molekul karbohidrat. Skema biosintesis senyawa stigmasterol dan sitosterol adalah sebagai berikut (Croteu, 2000):

2.6.4 Produksi Metabolit Sekunder Melalui Teknik Kultur *In Vitro*

Kultur jaringan merupakan salah satu teknik yang dapat digunakan sebagai sarana penghasil metabolit sekunder. Hal ini disebabkan metabolit sekunder merupakan hasil dari proses biokimia yang terjadi dalam tubuh tanaman, proses tersebut juga terjadi pada kultur jaringan. Senyawa ini terdapat pada kalus atau yang lain, seperti akar (Dalimonthe, 1987 dalam Parti, 2004). Menurut Hendaryono (1994) metabolit yang dihasilkan dari kalus juga memiliki kadar lebih tinggi daripada dengan cara biasa (dari tanaman).

Menurut Rahmawati (1999) sebelum inisiasi kultur jaringan, terjadi 3 fase, 1) fase penyesuaian, fase 2) fase pembelahan sel dan fase 3) fase stasioner (tidak ada lagi pertumbuhan). Senyawa metabolit sekunder biasanya terbentuk pada fase stasioner, sebagai akibat keterbatasan nutrisi dalam medium merangsang dihasilkannya enzim yang berperan untuk pembentukan metabolit sekunder dengan memanfaatkan metabolit primer guna mempertahankan kelangsungan hidup. Sintesis metabolit sekunder merupakan protektif tanaman ketika ada patogen dengan meningkatkan produksi fitoaleksin.

Biosintesis metabolit sekunder akan dilakukan oleh tanaman ketika nutrisi pada media tumbuh telah habis, adanya senyawa-senyawa tertentu pada lingkungannya yang merugikan ataupun adanya suatu senyawa yang dapat memicu produksi metabolit sekunder. ZPT merupakan senyawa yang dapat digunakan sebagai alat untuk memicu sintesis metabolit sekunder karena merupakan senyawa asing yang berusaha mempengaruhi tanaman agar melakukan pertumbuhan dengan cepat (Bulgakov, 2003).

Penggunaan metode kultur jaringan untuk menghasilkan metabolit sekunder memiliki beberapa keuntungan antara lain (Dalimonthe,1987):

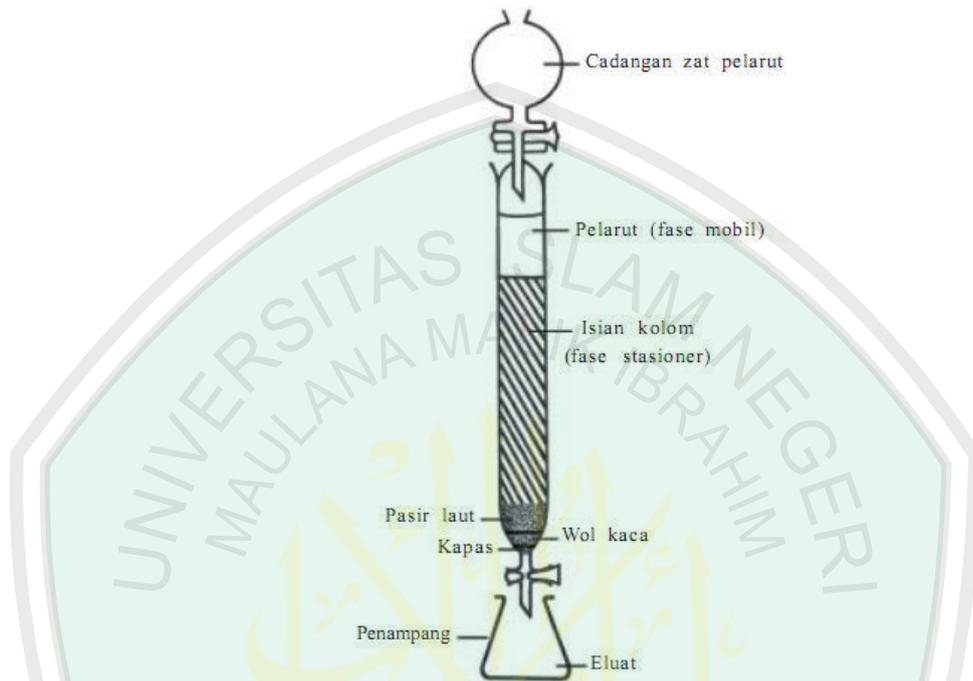
- 1) Metabolit sekunder dapat langsung diambil dari kalus atau suspensi sel sehingga tidak perlu dari tanaman asal.
- 2) Waktu yang diperlukan untuk memperoleh metabolit sekunder dalam kultur jaringan lebih singkat.
- 3) Kadar metabolit sekunder dalam kultur dapat ditingkatkan dengan cara antara lain penambahan zat pengatur tumbuh ke dalam media, memakai media lain yang lebih sesuai atau mengubah komponen media.

2.7 Kromatografi Kolom

Kromatografi adalah metode pemisahan berdasarkan proses migrasi dari komponen senyawa di antara dua fase, yaitu fase diam dan fase gerak. Fase gerak membawa zat terlarut melalui media fase diam sehingga terpisah dari zat terlarut lainnya yang terelusi lebih awal atau paling akhir karena perbedaan afinitas antara zat terlarut dengan fase diam. Keuntungan kromatografi sebagai metode kualitatif yaitu cuplikan senyawa yang dibutuhkan untuk analisis sedikit dalam waktu singkat (Hostettman, 1997).

Kromatografi kolom (Gambar 2.7) adalah kromatografi serapan yang dilakukan di dalam kolom, merupakan metode kromatografi terbaik untuk pemisahan campuran dalam jumlah besar. Campuran yang akan dipisahkan diletakkan berupa pita diatas bagian penyerap yang berada pada tabung kaca. Fasa gerak dibiarkan mengalir melalui kolom,disebabkan oleh gaya berat. Pita

senyawa terlarut bergerak melalui kolom dengan laju yang berbeda, memisah dan dikumpulkan berupa fraksi saat keluar dari kolom (Gritter, 1991).



Gambar.2.7 Alat Kromatografi Kolom (Gritter, 1991)

Tujuan kromatografi kolom adalah memisahkan komponen cuplikan, menjadi pita atau puncak, ketika cuplikan itu bergerak melalui kolom. Dalam praktek, dengan melihat bentuk puncak biasanya dapat ditaksir daya pisah sampai derajat yang memungkinkan kita memilih dengan cepat panjang kolom yang diperlukan untuk pemisahan. Keefisienan kolom merupakan fungsi dari parameter kolom, seperti laju aliran pelarut, ukuran partikel kemasan kolom, cara mengemas kolom, dan viskositas pelarut (Johnson, 1991)

Kolom kromatografi berupa pipa gelas yang dilengkapi dengan kran dan gelas penyaring didalamnya. Ukuran kolom tergantung pada banyaknya zat yang akan dipisahkan. Untuk menahan penyerap yang diletakkan di dalam

kolom dapat digunakan gelas wool atau kapas. Ukuran partikel penyerap untuk kolom biasanya lebih besar dari KLT yaitu 63-250 μm yang dijalankan dengan gaya tarik bumi. Pemisahan komponen secara kromatografi kolom dilakukan dalam suatu kolom yang diisi dengan fase stasioner dan cairan (pereaksi) sebagai fase mobil untuk mengetahui banyaknya komponen contoh yang keluar melalui kolom. Pengisian kolom dilakukan dengan memasukkan adsorben dalam bentuk larutan (*slurry*), dan partikelnya dibiarkan mengendap.

