

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Deskripsi Tanaman Pohpohan (*Pilea trinervia* Wright)

Menurut Siemonsma dan Piluek (1994), pohpohan merupakan tanaman terna yang tumbuh tegak hingga mencapai 2 m dan termasuk dalam suku Urticaceae. Pohpohan (Gambar 1) dapat tumbuh subur di daerah pegunungan, khususnya di daerah Jawa Barat pada ketinggian 500-2.700 m di atas permukaan laut. Pohpohan tumbuh di daerah lembab, baik yang mengandung sedikit atau banyak humus, di hutan-hutan dan di pinggir-pinggir jalan.

Kedudukan taksonomi pohpohan menurut Lin (2009):

Kerajaan : Plantae
Divisi : Angiospermae
Kelas : Dicotyledonas
Bangsa : Urticales
Suku : Urticaceae
Marga : *Pilea*
Jenis : *Pilea trinervia* Wight



Gambar 1. Tanaman Pohpohan (*Pilea trinervia* W.) (sumber: dokumentasi pribadi)

Menurut Ochse (1980), daun pohpohan banyak dikonsumsi masyarakat khususnya di daerah Jawa Barat, karena memiliki aroma khas yang banyak

disukai dan daunnya lunak. Bagian utama yang sering dikonsumsi adalah daun muda dari pucuk pohpohan. Pohpohan juga sering ditanam sebagai tanaman pagar atau ornamental.

B. Senyawa Metabolit pada Pohpohan

Pohpohan sebagai obat herbal yang memiliki khasiat karena mengandung senyawa kimia. Menurut Amalia dkk. (2006), daun pohpohan yang diekstrak menggunakan n-heksana, etil asetat dan etanol mengandung flavonoid, alkaloid dan steroida atau triterpenoida, asam askorbat, senyawa fenol, α -tokoferol, dan β -karoten yang berfungsi sebagai antioksidan.

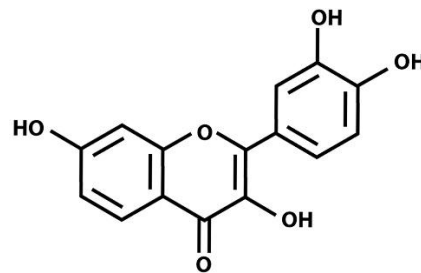
1. Flavonoid

Menurut Marston dan Hostettman (2006), senyawa flavonoid memiliki ikatan glikosida yang dapat didegradasi oleh aktivitas enzim yang didapatkan dari bahan tanaman baik dalam keadaan segar maupun kering. Ekstraksi senyawa flavonoid membutuhkan pelarut yang sesuai dengan sifat kepolarannya. Beberapa jenis flavonoid bersifat kurang polar, sedangkan flavonoid glikosida dan aglikon bersifat lebih polar.

Pigmen flavonoid menurut strukturnya merupakan turunan senyawa induk flavon berupa tepung putih yang terdapat pada tumbuhan, dan semuanya memiliki sejumlah sifat yang sama. Saat ini dikenal ada sekitar sepuluh kelas flavonoid, yaitu antosianin, proantosianidin, flavonol, flavon, glikoflavon, biflavonil, khalkon dan auron, flavanon, dan isoflavon (Harborne, 1987).

Kuersetin (Gambar 2) adalah salah satu flavonol dari kelompok

senyawa flavonoid polifenol yang didapatkan dalam hampir semua jenis tanaman. Kuersetin merupakan aglikon dari molekul rutin tanpa glikosida yang memiliki sifat fisikokimia yang penting diantaranya adalah sebagai antioksidan yang kuat, mereduksi oksidasi *low density lipoprotein* (LDL), sebagai vasodilator dan *blood thinner*, dapat membunuh virus seperti herpes, memiliki daya antihistamin, dapat menghambat COMT (*Catechol-O-Methyl Transferase*) yang mereduksi pemecahan epinephrin, serta dapat memperlambat *heat shock protein* yang dapat menyebabkan apoptosis pada sel-sel kanker dan sel-sel lainnya (Jusuf, 2010).



Gambar 2. Struktur Kimia Kuersetin (Sumber: Sugrani dan Waji, 2009)

Biosintesis kuersetin dalam sel tumbuhan akan dimulai dengan prekursor fenilalanin dan beberapa senyawa aktivator diantaranya satu molekul *4-coumaroyl-CoA* dan 3 molekul *malonyl-CoA*. Terdapat dua enzim utama dalam kegiatan sintesis ini yaitu *resveratrol synthase* atau disebut juga *stilbene synthase* (STS) dan *chalcone synthase* (CHS). Kedua enzim ini diperkirakan merupakan kunci reaksi biosintesis semua senyawa flavonoid pada tumbuhan dan merupakan homodimerik dari polyketide synthase spesifik tumbuhan (Tropf, dkk., 1995 dalam Jusuf, 2010).

Enzim *stilbene synthase* (STS) dan *chalcone synthase* (CHS) ini,

bekerja melakukan kondensasi menggunakan 3 reaksi kondensasi sekuensial dengan malonyl CoA membentuk senyawa antara tetraketida, hanya saja pada STS akhir pembentukan inti cincinnya berupa tetraketida linear yang selanjutnya tergantung dari aktivitas kedua enzim diatas, yaitu apabila CHS yang aktif maka akan terbentuk hasil akhir kuersetin, sedangkan jika enzim STS yang aktif maka produk akhirnya adalah reservatrol (Jusuf, 2010).

2. Alkaloid

Alkaloid berasal dari Bahasa Arab "*al-qali*", merupakan komponen yang mengandung atom nitrogen dan memiliki kegiatan farmakologis yang aktif. Jenis alkaloid yang pertama kali ditemukan adalah morfin dari tumbuhan opium (*Papaver soniferum*) oleh Sertuner pada 1806, dan sampai sekarang ada lebih dari 10.000 jenis alkaloid yang telah diisolasi dan diketahui strukturnya (Southon dan Buckingham, 1989 dalam Kutchan, 1995).

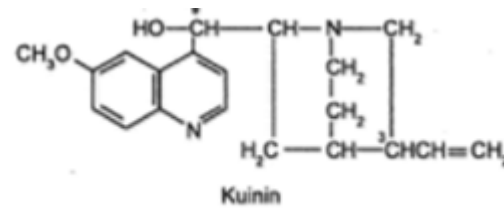
Pada umumnya alkaloid mencakup senyawa yang bersifat basa yang mengandung satu atau lebih atom nitrogen sebagai bagian dari sistem siklik. Alkaloid biasanya bersifat optis aktif, kebanyakan berbentuk kristal tetapi hanya sedikit yang berupa cairan pada suhu kamar (Harborne, 1987). Biosintesis alkaloid sangat sulit dipelajari, hal ini disebabkan karena struktur kimia dari sebagian besar alkaloid sangat kompleks yang memiliki struktur tengah yang asimetris. Enzim-enzim yang terlibat dalam biosintesis alkaloid mulai ditemukan pada tahun 1970an ketika

digunakannya kultur sel sebagai sistem percobaan. Terdapat 80 enzim yang terlibat dalam proses katalisis indol, isokuinolin, tropana, pirolizidin, dan purin (Kutchan, 1995).

Alkaloid seringkali beracun bagi manusia, namun banyak memiliki kegiatan fisiologis yang menonjol, sehingga alkaloid digunakan secara luas di bidang pengobatan. Terdapat 13.000 tanaman yang telah dimanfaatkan sebagai obat di seluruh dunia dalam bentuk (1) komponen murni diantaranya yang memiliki sifat narkotik dan analgesik yaitu morfin, analgesik dan antitusif yaitu kodein dan agen kemoterapeutik vinkristin dan *vinblastine*; (2) ekstrak, yang banyak dijadikan teh (Tyler, 1994). Selain itu, beberapa komponen dari tumbuhan ini juga dimanfaatkan sebagai contoh untuk membuat obat sintetis (buatan) seperti *tropicamide* dari *atropine*, *chloroquine* dari kuinin, dan *procaine* serta *tetracaine* dari *cocaine* (Kutchen, 1995).

Alkaloid yang banyak digunakan salah satunya adalah senyawa kuinin ($C_{20}H_{24}N_2O_2$) (Gambar 3), yang pertama kali ditemukan dari tanaman kina sebagai obat antimalaria. Kuinin merupakan alkaloid yang mempunyai lingkaran kuinolin, berasa pahit, tidak berbau, sukar larut dalam air tetapi larut dalam alkohol, eter, dan kloroform. Kristal trihidrat kuinin mencair pada suhu 57 °C, dan bentuk anhidratnya mencair pada suhu 117 °C. Garam-garam kuinin diantaranya adalah kuinin hidroklorida dan kuinin sulfat larut dalam air dan memancarkan fluoresensi berwarna biru. Kuinin dan garam-garamnya memiliki khasiat analgesik dan antipiretik

(Sumardjo, 2009).



Gambar 3. Stuktur kimia kuinin (Sumardjo, 2009)

C. Kultur *In Vitro*

Kultur *in vitro* adalah suatu ilmu dan teknik untuk menumbuhkan sel, jaringan atau organ tanaman pada medium buatan (George, 2008). Melalui teknik kultur jaringan, sel atau jaringan tanaman yang diisolasi dari bagian tanaman seperti protoplasma, sel atau sekelompok sel, yang setelahnya disebut eksplan, akan distimulasi untuk membentuk tanaman secara utuh menggunakan media dan lingkungan tumbuh yang diatur (Gunawan, 1987). Pada media aseptik yang mengandung unsur hara makro dan mikro, Fe, vitamin, dan zat pengatur tumbuh yang diperlukan tanaman, sel atau jaringan tersebut akan membelah dan membentuk kalus maupun organ tanaman seperti tunas dan akar secara langsung. Kalus yang tumbuh selanjutnya akan distimulasi untuk membentuk tanaman sempurna (Haryanto, 1991). Menurut Geier (1990), pemilihan eksplan dalam kultur jaringan berperan penting dalam menunjang keberhasilannya. Selain pemilihan eksplan, penggunaan medium yang sesuai, keadaan yang aseptik, dan pengaturan udara yang baik terutama untuk kultur cair akan mempengaruhi keberhasilan kegiatan tersebut (Hendaryono dan Wijayani, 1994).

Kultur *in vitro* biasanya digunakan untuk produksi metabolit sekunder

karena memiliki beberapa kelebihan, diantaranya kecepatan pertumbuhan sel yang cepat dan material tumbuhan yang digunakan hanya sedikit (Babu dkk., 2011). Produksi metabolit sekunder melalui kultur *in vitro* dipengaruhi oleh berbagai faktor genetik maupun lingkungan. Adanya perbedaan kondisi lingkungan pertumbuhan antara kultur *in vitro* dan tanaman asal, memungkinkan terjadi perbedaan kandungan metabolit sekundernya baik secara kualitatif maupun kuantitatif (Wardani dkk., 2004).

Menurut Nurheti (2010), setiap sel berasal dari satu sel. Teori totipotensi sel artinya, setiap sel memiliki potensi genetik seperti zigot, yaitu mampu memperbanyak diri dan berdiferensiasi menjadi tanaman lengkap. Teknik KJT dapat berhasil bila syarat-syarat yang diperlukan terpenuhi, yaitu pemilihan eksplan yang baik, penggunaan medium yang cocok, dan keadaan yang aseptik. Pada prinsipnya semua jenis sel dapat ditumbuhkan, pemilihan bagian tanaman yang masih muda dan mudah tumbuh, yaitu meristem, misalnya daun muda, ujung batang, keping biji dan lainnya (Hendaryono dan Wijayani, 1994).

Secara umum, usaha untuk peningkatan produksi metabolit sekunder yang diproduksi menggunakan teknik KJT adalah dengan penambahan enzim yang dibutuhkan oleh sel untuk menghasilkan metabolit sekunder tertentu. Usaha lain yang dapat dilakukan adalah optimalisasi medium yang digunakan, serta dapat juga dengan optimalisasi penggunaan ZPT maupun bioregulator (Becker dan Sauerwen, 1990). Menurut Zakiah dkk., (2003), salah satu metode pendekatan untuk peningkatan produksi metabolit sekunder dengan penambahan ZPT. Penambahan ZPT ke dalam medium dapat merangsang

aktivitas enzim tertentu yang terlibat dalam jalur biosintesis, sehingga meningkatkan produksi metabolit sekunder.

D. Sterilisasi Eksplan

Sterilisasi adalah proses untuk mematikan spora mikroorganisme sampai tidak memungkinkan untuk menjadi sumber kontaminan maupun berkembang biak selama proses pengembangan kultur jaringan berlangsung (Sandra dan Karyaningsih, 2000). Setiap tanaman memiliki tingkat kontaminasi dan penanganan yang berbeda, sehingga penanganan kontaminasi pada eksplan dilakukan tergantung pada kondisi fisiologis tanaman dan lingkungannya (Gunawan, 2002). Menurut Santoso dan Nursandi (2002), sumber kontaminan tidak hanya berada pada bagian permukaan saja tetapi juga berada di bagian dalam eksplan. Mikrobial yang terdapat pada permukaan biasanya akan berkembang biak lebih cepat, sedangkan yang berada di bagian dalam akan membutuhkan waktu yang lebih lama.

Menurut Hendaryono dan Wijayani (1994), sterilisasi eksplan dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu secara mekanik dan kimia. Sterilisasi secara mekanik dapat dilakukan dengan membakar eksplan di atas lampu spiritus sebanyak tiga kali dan hanya dilakukan untuk eksplan yang keras atau berdaging. Sterilisasi secara kimia adalah sterilisasi menggunakan bahan kimia dengan cara direndam. Sterilisasi secara kimia digunakan untuk eksplan yang lunak (jaringan muda) seperti daun, tangkai daun, anther, biji, dan sebagainya. Bahan-bahan kimia yang dapat dan biasanya digunakan adalah natrium hipoklorit, merkuri klorit, dan alkohol 70% (Tabel 1)

Tabel 1. Bahan kimia yang umum digunakan untuk bahan sterilisasi (Hendaryono dan Wijayani, 1994)

Desinfektan	Konsentrasi	Waktu Perlakuan (Menit)
Benzalkonium klorida	0,01-0,1%	5-20
Larutan Bromin	1-2%	2-10
Kalsium Hipoklorit	9-10%	5-30
Etil Alkohol	75-95%	Beberapa detik-beberapa menit
Hidrogen Peroksida	3-12%	5-15
Merkuri Klorida	0,1-1,0%	2-10
Perak Nitrat	1%	5-30
Sodium Hipoklorit	0,5-5%	5-30

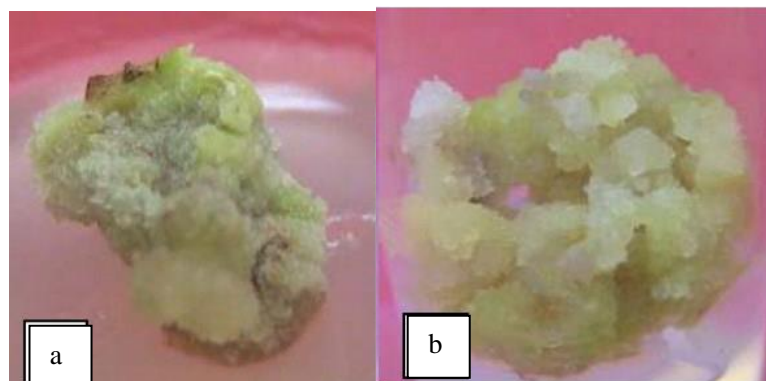
E. Eksplan dan Kalus

Eksplan adalah bagian tanaman yang dijadikan inokulum awal yang ditanam dalam medium, yang akan menunjukkan pertumbuhan perkembangan tertentu (Gunawan, 1987). Menurut George dan Sherrington (1987), ukuran eksplan sangat berpengaruh terhadap keberhasilan eksplan *in vitro*. Apabila ukuran potongan eksplan terlalu kecil menyebabkan ketahanan eksplan yang kurang baik dalam kultur ketika dilakukan sterilisasi, sebaliknya apabila terlalu besar eksplan akan mudah terkontaminasi oleh mikroorganisme.

Kalus adalah proliferasi masa jaringan yang belum terdiferensiasi. Kalus ini dapat digunakan sebagai salah satu identifikasi keberhasilan teknik kultur jaringan. Masa sel ini terbentuk di seluruh permukaan irisan eksplan sehingga semakin luas permukaan irisan semakin banyak kalus yang terbentuk (Hendaryono dan Wijayani, 1994). Terbentuknya kalus pada bagian eksplan yang terluka disebabkan oleh otolisis sel, dan dari sel yang rusak tersebut akan dihasilkan senyawa-senyawa yang akan merangsang pembelahan sel pada lapisan berikutnya (Gunawan 1987). Kalus dapat diinisiasi dari hampir

semua bagian tanaman, tetapi bagian organ yang berbeda akan memiliki kecepatan pembelahan sel yang berbeda (Hartman, dkk., 1990).

Menurut Sudirga (2002), terbentuknya kalus disebabkan adanya penambahan zat pengatur eksogen. Secara morfologi, kalus yang terbentuk memiliki beberapa tekstur dan warna tertentu. Menurut Pierik (1987), perbedaan tekstur kalus tergantung jenis tanaman yang digunakan, komposisi nutrisi yang terdapat dalam medium, ZPT dan kondisi lingkungan kultur. Secara tekstur kalus dibedakan antara kalus yang berstruktur *non-friable* yang merupakan kalus kompak yang berasal dari sel yang kuat (Gambar 4a) dan struktur *friable* (meremah) yang merupakan kalus yang mudah terlepas (Gambar 4b) (Syahid, 2008). Menurut Dwimahyani (2007), kalus yang semakin *friable* akan semakin memudahkan sel untuk melakukan separasi secara sempurna. Kondisi warna kalus dapat bervariasi, hal ini disebabkan oleh adanya pigmentasi, pengaruh cahaya, dan bagian tanaman yang dijadikan sumber eksplan (Hendaryono dan Wijayani, 1994).



Gambar 4. Bentuk dan tekstur kalus dari eksplan daun Ramin (*Gonystylus bamcamus* (Miq) Kurz.) (Yelnititis, 2012)
Keterangan: A. Kalus bertekstur kompak; B. Kalus bertekstur meremah

F. Medium Kultur Jaringan

Pertumbuhan dan morfogenesis dari jaringan tumbuhan secara *in vitro* dipengaruhi salah satunya dari komposisi medium kultur. Sebagian besar kebutuhan nutrisi dasar setiap tumbuhan adalah sama, namun untuk memperoleh pertumbuhan yang optimum dari suatu jaringan tumbuhan dalam kondisi laboratorium bisa berbeda sesuai kebutuhan jenis tumbuhan itu sendiri. Komponen utama dalam medium kultur jaringan tumbuhan diantaranya adalah nutrisi anorganik (makro dan mikro), sumber karbon, suplemen organik, zat pengatur tumbuh (hormon), dan agen pematang (Razdan, 2002).

Makronutrien yang dibutuhkan misalnya: karbon (C), hidrogen (H), oksigen (O), nitrogen (N), belerang/sulfur (S), fosfor (P), kalium (K), kalsium (Ca), dan magnesium (Mg). Mikronutrien yang dibutuhkan antara lain seng (Zn), mangan (Mn), Tembaga (Cu), boron (B), molibdenum (Mo), silikon (Si), aluminium (Al), klor (Cl), kobalt (Co), dan besi (Fe). Media tanam pada kultur *in vitro* berisi kombinasi dari asam amino esensial, garam-garam anorganik, vitamin-vitamin, larutan buffer, dan karbohidrat (Ryugo, 1988). Sukrosa biasanya diberikan pada konsentrasi 20-30 g/L dan hampir semua hasil kultur memperlihatkan respon pertumbuhan yang optimum dengan pemberian disakarida dalam bentuk sukrosa. Penambahan sumber karbon akan mempercepat proliferasi sel dan regenerasi tunas (Razdan, 2002)

Vitamin memiliki fungsi katalitik pada sistem enzim dan dibutuhkan dalam jumlah kecil. Vitamin dan asam amino dibutuhkan untuk mendapatkan

pertumbuhan yang baik dari suatu jaringan tumbuhan. Macam vitamin yang sering digunakan adalah *thiamine* (B1), *nicotinic acid* (B3), kalsium pantotenat (B5), *pyridoxine* (B6), dan *myoinositol*. Vitamin biasanya ditambahkan sebanyak 0,1 - 10 mg/l.

Medium *Murashige and Skoog* (MS) merupakan medium yang mengandung komposisi garam yang lengkap dan umum digunakan untuk hampir semua jenis kultur (Razdan, 2002). Medium MS mengandung makronutrien, mikronutrien, vitamin yaitu thiamin HCL, asam nikotinat, piridoksin HCL, dan myo-inositol, dan asam amino berupa glisin (Hendaryono dan Wijayani, 1994). Sejumlah agar ditambahkan sebagai bahan pematat untuk mendapatkan media semi padat yang nantinya akan digunakan untuk meletakkan eksplan (Wetherell. 1982).

G. Zat Pengatur Tumbuh Berupa Kinetin dan 2,4-D

Menurut Narayanaswamy (1994), zat pengatur tumbuh (ZPT) merupakan zat adiktif yang ditambahkan ke dalam medium untuk membantu pertumbuhan kultur. Zat pengatur tumbuh adalah molekul-molekul yang kegiatannya mengatur reaksi-reaksi metabolik penting. ZPT mencakup hormon tumbuhan (alami) dan senyawa-senyawa buatan yang dapat mengubah tumbuh dan perkembangan tumbuhan. Terdapat beberapa kelas dari ZPT yang digunakan, yaitu auksin, sitokinin, giberelin, etilen, dan asam absisat (Machakova dkk., 2008).

Penggunaan zat pengatur tumbuh dalam kultur jaringan tanaman sangat penting, yaitu untuk mengontrol organogenesis dan morfogenesis dalam

pembentukan dan perkembangan tunas dan akar, serta pembentukan kalus. Terdapat dua golongan ZPT yang sering digunakan dalam kultur *in vitro*, yaitu sitokinin dan auksin. Penggunaan sitokinin dan auksin dalam satu media menghasilkan pengaruh sinergisme sehingga dapat memacu daya aktivitas zat pengatur tumbuh satu sama lain (Davies, 1995). Sitokinin biasanya digunakan dalam pembentukan tunas, sedangkan auksin digunakan untuk pembentukan kalus dan akar. Kedua zat pengatur ini sering dikombinasikan pada perbandingan (rasio) tertentu. Hal ini disebabkan karena kombinasi zat pengatur tertentu dapat meningkatkan daya aktivitas zat pengatur tumbuh satu sama lain (Lestari, 2011).

Kombinasi antara sitokinin dan auksin dapat memacu morfogenesis dalam pembentukan tunas. Auksin yang ada akan berperan sebagai inisiasi kalus, dengan adanya sitokinin, maka pembentukan tunas adventif menjadi lebih aktif. Penggunaan sitokinin dan auksin dalam satu media dapat memacu proliferasi tunas karena adanya pengaruh sinergisme antara zat pengatur tumbuh tersebut (Davies, 1995). Sitokinin berfungsi dalam stimulasi pembelahan sel, poliferasi kalus, dan pembentukan tunas, memacu proliferasi meristem ujung, menghambat pertumbuhan akar, serta mendorong pembentukan klorofil pada kalus (Santoso dan Nursandi, 2002).

Kinetin adalah ZPT sitokinin yang memiliki kemampuan untuk menginduksi pembelahan sel. Kinetin sering digunakan pada kultur suspensi sel dan jaringan tanaman untuk menginduksi kalus dan untuk menumbuhkan tunas dari kalus (Duszka dkk., 2009). Menurut Lestari (2011), untuk tanaman

herba diperlukan kinetin dengan konsentrasi yang rendah, yaitu berkisar 0,1-1 mg/l.

Selain kinetin, zat pengatur tumbuh yang dapat digunakan dalam induksi kalus adalah asam 2,4 diklorofenoksiasetat atau yang lebih dikenal dengan 2,4 D. Auksin berasal dari bahasa Yunani yang artinya tumbuh. Auksin merupakan zat pengatur tumbuh yang mampu berperan menginduksi terjadinya kalus. Selain itu, auksin juga berperan mendorong proses morfogenesis kalus. 2,4 D merupakan golongan auksin sintetis yang sifatnya stabil karena tidak mudah terurai oleh enzim yang dihasilkan oleh sel ataupun pemanasan. ZPT 2,4 D sering digunakan untuk menginduksi pembentukan kalus embrionik dan paling efektif dalam memacu pembentukan kalus (Hendaryono dan Wijayani, 1994).

Konsentrasi penggunaan 2,4 D harus diperhatikan sebab dalam konsentrasi rendah akan menginduksi kalus, namun pada konsentrasi tinggi akan menyebabkan mutasi karena 2,4 D bersifat herbisida dan biasanya konsentrasinya lebih rendah daripada kinetin (Goldsworthy dan Mina, 1991). Penambahan 2,4 D dalam medium akan merangsang pembelahan dan pembesaran sel pada eksplan sehingga dapat memacu pembentukan dan pertumbuhan kalus serta meningkatkan senyawa kimia alami flavonoid (Rahayu dkk., 2003).

Wattimena dkk. (1992) menyatakan, kecepatan sel membelah dapat dipengaruhi oleh adanya kombinasi auksin-sitokinin tertentu dalam konsentrasi tertentu tergantung pada tanamannya, juga faktor-faktor luar

seperti cahaya dan temperatur. Selain auksin, sitokinin juga berfungsi untuk menstimulasi pembelahan sel pada masa pro-embriogenik sel, sehingga keduanya dibutuhkan untuk inisiasi kalus embrionik (Jimnez dan Bangerth, 2001).

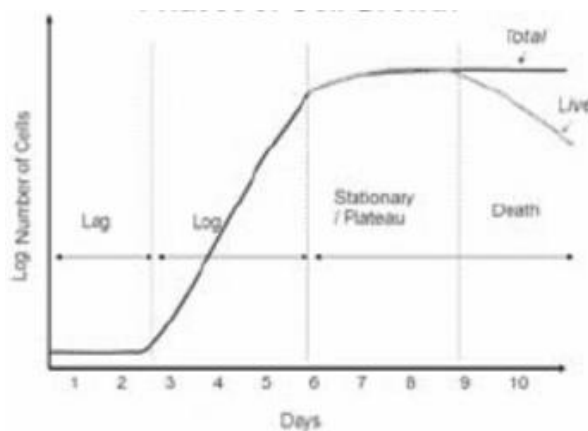
H. Kultur Suspensi Sel

Kultur suspensi sel adalah suatu metode perbanyakan sel dengan menggunakan medium cair yang mengandung berbagai nutrisi yang dibutuhkan untuk pertumbuhan optimal yang menyebabkan sel tidak terdiferensiasi. Metode ini menggunakan penggojogan agar agregat sel pecah menjadi kumpulan sel-sel kecil dan sel tunggal yang menyebar di dalam medium cair. Kultur suspensi sel tanaman bertujuan untuk penelitian biokimia dan fisiologi sel, pertumbuhan, metabolisme, fusi protoplas, transformasi dan pada skala besar atau menengah digunakan sebagai produksi metabolit sekunder. Hal ini disebabkan karena kemampuannya memproduksi senyawa yang berkhasiat yang dibutuhkan dalam waktu singkat. Metode ini juga digunakan untuk memproduksi senyawa-senyawa yang tidak dapat diproduksi melalui perbanyakan tanaman secara konvensional (Hutami, 2009).

Eksplan yang dimasukkan ke dalam media cair akan mengalami periode pertumbuhan (Gambar 5) periode awal (*lag phase*) yaitu periode awal sel menunjukkan gejala pembelahan. Setelah fase lag, fase selanjutnya adalah fase log yang menunjukkan adanya peningkatan jumlah sel. Fase selanjutnya adanya perlambatan secara berangsur-angsur pada tingkat pembelahan, dan diakhiri dengan fase stasioner yaitu fase sel-sel tidak melakukan pembelahan

lebih lanjut. Perhitungan sel untuk mengetahui fase-fase pertumbuhan sel dapat menggunakan sistem *packed cell volume*. Sistem ini menggunakan prinsip pemampatan sel pada botol ukur dan diukur volume dalam satuan ml (Dwimahyani, 2007).

Menurut Dwimahyani (2007), mekanisme pembentukan sel tunggal atau sel embriogenik dimulai dari pembelahan terus menerus dari kalus yang telah diinisiasikan dalam media cair. Pada permukaan kalus akan terbentuk kelompok sel meristematik yang akan memecah dan membaur dalam media cair membentuk sel tunggal. Sel akan terus membesar dan membentuk gumpalan atau globular.



Gambar 5 . Hubungan jumlah total sel per unit volume terhadap waktu dalam pertumbuhan suspensi sel yang dibiakkan dalam kondisi *batch culture* (ECACC, 2010).

Selama masa inkubasi kultur suspensi sel, perlu dilakukan subkultur agar kualitas dari suspensi dapat meningkat dan dapat menghasilkan sel tunggal yang homogen (Strosse dkk., 2003 dalam Dwimahyani, 2007). Dalam melakukan subkultur, perlu dilakukan penentuan kadar kepadatan sel

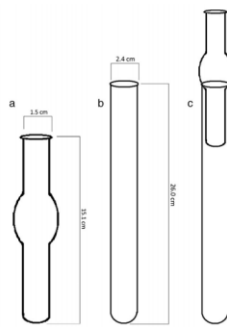
karena subkultur harus dilakukan tepat waktu yaitu saat kepadatan sel mencapai pada tahap maksimum. Rata-rata kultur suspensi sel kepadatan sel maksimum tercapai pada kurang lebih 18-25 hari, walaupun begitu, waktu optimum pada beberapa kultur yang sangat aktif bisa sangat pendek yaitu sekitar 6-9 hari (Jhon dan Roberts, 1993 *dalam* Dwimahyani, 2007).

I. Ekstraksi

Ekstraksi merupakan proses pemisahan senyawa terlarut ke dalam pelarut. Senyawa yang bersifat anorganik atau senyawa polar dapat terlarut oleh senyawa polar, sedangkan senyawa organik atau nonpolar dapat terlarut oleh pelarut nonpolar (Pescok dkk., 1976). Ekstraksi yang tepat bergantung pada tekstur dan kandungan air dari bahan tumbuhan yang akan diekstraksi dan jenis senyawa yang akan diisolasi. Umumnya sebelum dilakukan ekstraksi, pencegahan akan oksidasi maupun hidrolisis senyawa dalam tumbuhan perlu dilakukan dengan cara pengeringan atau perendaman ke dalam etanol mendidih (Harborne, 1987).

Metode ekstraksi dapat dikelompokkan menjadi dua, yaitu ekstraksi sederhana dan ekstraksi khusus (Harborne, 1987). Refluks merupakan metode ekstraksi yang dilakukan dengan merendam materi tumbuhan menggunakan pelarut tertentu dalam labu bulat yang dihubungkan dengan kondensor. Pelarut kemudian dipanaskan hingga mencapai titik didih dan uap akan terkondensasi sehingga pelarut akan kembali ke labu ekstraksi. Kelemahan dari metode ini adalah senyawa yang sensitif dengan suhu tinggi dapat terdegradasi (Seidel, 2006).

Cold finger (Gambar 6) merupakan metode modifikasi dari metode refluks yang bertujuan untuk mengekstraksi suatu materi tumbuhan dalam skala yang kecil. Metode ini menggunakan sebuah tabung gelas yang berbentuk jari, yang diletakkan di atas tabung penyari selama proses penyarian dengan pemanasan. Tabung *cold finger* diisi air dengan tujuan untuk mendinginkan bagian atas dari tabung penyari sehingga uap pelarut terkondensasi dan menjaga senyawa volatil tidak hilang akibat penguapan (Ferreira dkk., 2013).



Gambar 6. Skema Tabung *Cold Finger* (Ferreira dkk., 2013)
Keterangan: a. Tabung *Cold Finger*; b. Tabung Penyari; c.
Penggambaran Metode *Cold Finger*

I. Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi adalah suatu metode pemisahan fisik dimana komponen-komponen yang dipisahkan didistribusikan di antara dua fase, salah satu fase tersebut adalah suatu lapisan stasioner dengan permukaan yang luas, yang lainnya sebagai fluida yang mengalir lembut sepanjang landasan stasioner (Day dan Underwood, 2002). Kromatografi lapis tipis merupakan salah satu analisis dari suatu sampel yang ingin dideteksi dengan memisahkan komponen-komponen sampel berdasarkan perbedaan kepolaran. Prinsip

kerjanya memisahkan sampel berdasarkan perbedaan kepolaran antara sampel dengan pelarut yang digunakan. Teknik ini biasanya menggunakan fase diam dari bentuk plat silika dan fase geraknya disesuaikan dengan jenis sampel yang ingin dipisahkan. Larutan atau campuran larutan yang digunakan dinamakan eluen (Skoog dkk., 1996).

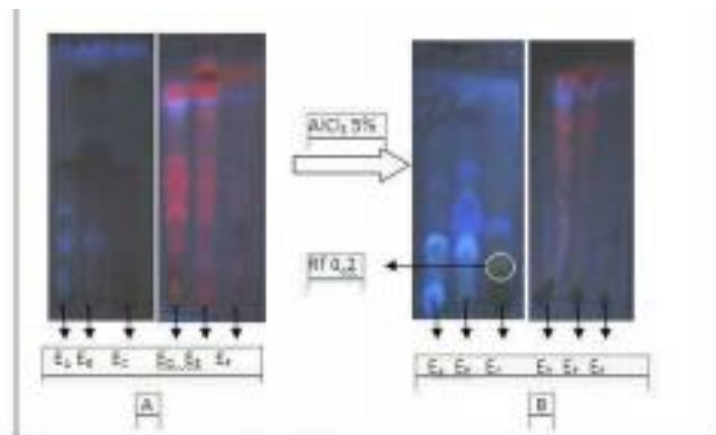
Menurut Abdul (2007), KLT merupakan bentuk kromatografi planar, selain kromatografi kertas dan elektroforesis. Fase gerak yang dikenal sebagai pelarut pengembangan akan bergerak sepanjang fase diam karena pengaruh kapiler pada pengembangan secara menaik (*ascending*), atau karena pengaruh gravitasi pada pengembangan secara menurun (*descending*).

Fase diam yang digunakan dalam KLT yang paling banyak digunakan adalah silika gel. Silika gel memiliki sifat pemisahan yang baik yang memiliki zat penyerap yang secara merata dilapiskan pada penyangga dengan ketebalan lapisan 0,1 – 1,3 mm (Apriani, 2015). Fase gerak pada KLT dapat dipilih dari pustaka yang sudah ada, tetapi lebih sering dengan metode *Trial and error*. Sistem yang paling sederhana ialah campuran dua pelarut organik, karena daya elusi campuran kedua pelarut ini dapat mudah diatur sedemikian rupa sehingga pemisahan dapat terjadi secara optimal (Abdul, 2007).

Beberapa keuntungan dari kromatografi lapis tipis adalah dalam pelaksanaannya lebih mudah dan murah daripada kromatografi kolom, yang digunakan lebih sederhana dan dapat dikatakan bahwa hampir semia laboratorium dapat melaksanakannya secara cepat setiap saat. Keuntungan lainnya adalah banyak digunakan untuk analisis, dapat dilakukan elusi secara

ascending maupun *descending*, ketepatan penentuan kadar lebih baik karena komponen yang ditentukan merupakan bercak yang tidak bergerak, dan identifikasi pemisahan komponen dapat dilakukan dengan pereaksi warna, fluoresensi, atau radiasi sinar UV (Abdul, 2007).

Proses awal dilakukan dengan penotolan sampel yang memiliki ukuran bercak sekecil dan sesempit mungkin. Setelah penotolan, tahap selanjutnya adalah elusi, yaitu memasukkan sampel tersebut dalam suatu bejana kromatografi yang sebelumnya telah dijenuhkan dengan uap fase gerak. Tepi bagian bawah lempeng lapis tipis yang telah ditotoli sampel dicelupkan ke dalam fase gerak kurang lebih 0,5-1 cm. Selama proses elusi, bejana kromatografi harus ditutup rapat. Elusi dilakukan sampai eluen (fase gerak) mencapai batas atas dan kemudian dilakukan pemaparan pada sinar UV untuk melihat bercak senyawa (Abdul, 2007).



Gambar 7. Contoh Hasil Pemisahan Menggunakan Metode KLT (Ariyanti dkk., 2013)

Pemisahan suatu senyawa tergantung pada jenis pelarut, zat penyerap, dan sifat daya serap masing-masing senyawa. Senyawa terlarut akan terserap oleh fase diam (penyerap) kemudian bergerak (Gambar 7) sesuai kecepatan

komponen terlarut dalam fase gerak (eluen) sehingga akan terlihat bercak pemisahan komponen pada fase diam (Apriani, 2015).

Perbandingan kecepatan nantinya dinyatakan dalam R_f (*Rate of Flow*) yang berguna dalam identifikasi senyawa. Nilai R_f untuk senyawa murni dapat dibandingkan dengan nilai R_f dari senyawa standar. Nilai R_f dapat didefinisikan sebagai jarak yang ditempuh oleh senyawa dari titik asal dibagi dengan jarak yang ditempuh oleh pelarut dari titik asal. Oleh karena itu bilangan R_f selalu lebih kecil dari 1,0 (Gandjar dan Rohman, 2007). Nilai R_f didapatkan dari persamaan berikut:

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh senyawa terlarut}}{\text{Jarak yang ditempuh pelarut}}$$

K. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi atau KCKT (Inggris: *High Performance Liquid Chromatography / HPLC*) adalah suatu teknik pemisahan yang diterima secara luas untuk analisis dan pemurnian senyawa tertentu dalam suatu sampel pada sejumlah bidang, seperti bidang farmasi, lingkungan, bioteknologi, polimer, dan industri makanan. Teknik ini dikembangkan pada akhir 1960-an dan awal tahun 1970-an (Gholib dkk., 2011). KCKT merupakan teknik pemisahan komponen campuran senyawa kimia terlarut dengan sistem adsorpsi pada fase diam padat atau sistem partisi diantara fase diam cair yang terikat pada penyangga padat dan fase gerak cair (Setiadarma dkk., 2004).

Kegunaan umum KCKT adalah untuk pemisahan sejumlah senyawa organik, anorganik, maupun senyawa biologis, analisis ketidakmurnian,

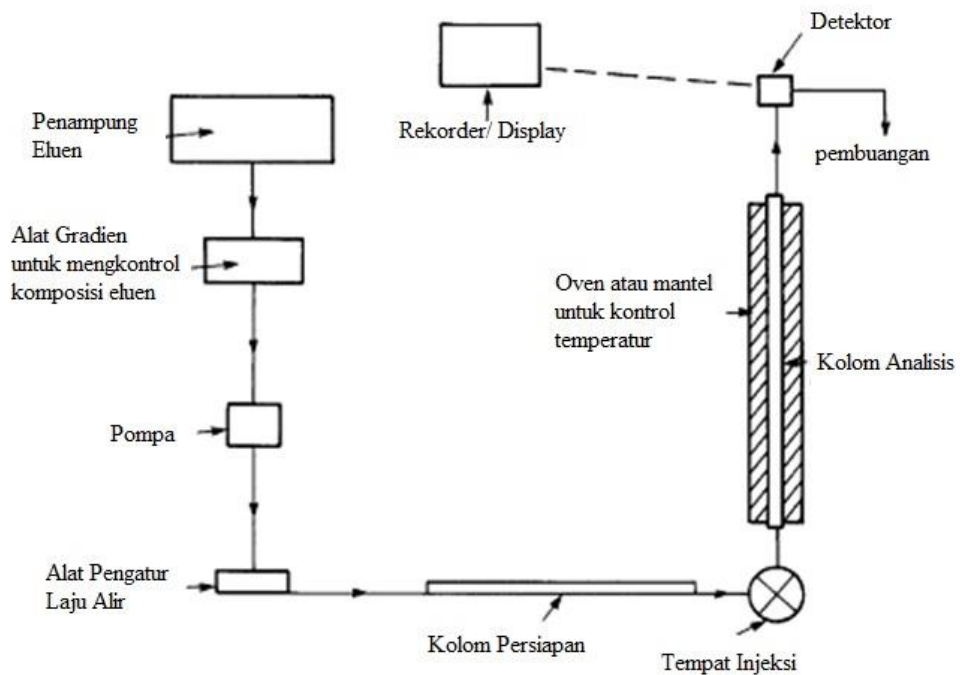
analisis senyawa-senyawa tidak mudah menguap (*non-volatile*), penentuan molekul-molekul netral, ionik, maupun zwiter ion, isolasi, dan pemurnian senyawa, pemisahan senyawa-senyawa yang strukturnya hampir sama, pemisahan senyawa-senyawa dalam jumlah sedikit (*trace elements*), dalam jumlah banyak sampai skala industri. Metode ini tidak destruktif dan dapat digunakan baik untuk analisis kualitatif maupun kuantitatif (Gholib dkk., 2011).

Menurut Setiadarma dkk., (2004), KCKT dapat memisahkan makromolekul, bahan alam yang tidak stabil, ion, polimer, dan berbagai gugus polifungsi dengan berat molekul tinggi. Hasil dari pemisahan KCKT adalah hasil antar aksi spesifik pada molekul senyawa dengan fase pada KCKT yaitu fase diam dan fase gerak. KCKT memiliki kecepatan dan sensitifitas yang paling baik diantara kromatografi lainnya. Komponen utama pada KCKT adalah reservoir fase gerak, pompa bertekanan tinggi, injektor, kolom, detektor, dan rekorder atau integrator (Gambar 8)

Fase gerak yang biasanya digunakan dalam identifikasi senyawa adalah metanol, acetonitril, dan tetrahidrofur. Tetrahidrofur memberikan hasil pemisahan yang paling baik, diikuti acetonitril dan metanol. Pada identifikasi flavonoid, fase gerak yang biasa digunakan adalah metanol dan acetonitril (Lee, 2000).

Keuntungan penggunaan KCKT adalah kemampuannya untuk menangkap komponen dengan stabilitas panas yang terbatas ataupun yang bersifat volatil. KCKT merupakan metode yang sensitif, selektif, dan

memiliki tingkat otomatisasi yang tinggi, sehingga lebih sederhana dalam pengoperasiannya. metode ini banyak dipilih karena kemudahannya injeksi, deteksi, dan pengolahan data, serta dapat digunakan untuk berbagai macam sampel (Macrae, 1988).



Gambar 8. Instrumen KCKT (Boyes, 2010)

L. Hipotesis

1. Kalus eksplan daun tanaman pohpohan (*Pilea trinervia* W.) terbaik dihasilkan dari kombinasi 2,4 D 0,5 ppm dan kinetin 0,1 ppm.
2. Pertumbuhan kalus dengan menggunakan metode kultur suspensi sel pada medium MS cair meliputi fase *lag*, fase eksponensial, fase linier, dan fase stasioner.
3. Kalus dari eksplan daun pohpohan (*Pilea trinervia* W.) mengandung flavonoid dan alkaloid.