

JURNAL

**ANALISIS KANDUNGAN FLAVONOID DAN ALKALOID PADA KALUS
TANAMAN POHPOHAN (*Pilea trinervia* W.) YANG DIINDUKSI DENGAN
HORMON KINETIN DAN 2,4 DIKLOROFENOKSIASETAT**

Disusun oleh:
Lintar Respati Kusumawardhani
NPM: 120801296



**UNIVERSITAS ATMA JAYA YOGYAKARTA
FAKULTAS TEKNOBIOLOGI
PROGRAM STUDI BIOLOGI
YOGYAKARTA
2017**

ANALISIS KANDUNGAN FLAVONOID DAN ALKALOID PADA KALUS
TANAMAN POHPHAN (*Pilea trinervia* W.) YANG DIINDUKSI DENGAN
HORMON KINETIN DAN 2,4 – DIKLOOROFENOKSIASETAT

FLAVONOIDS AND ALKALOIDS ANALYSIS OF POHPHAN (*Pilea
trinervia* W.) LEAVES CALLUS INDUCED BY KINETIN AND 2,4 –
DICHLOROPHENOXY ACETIC ACID

Lintar Respati Kusumawardhani¹, Exsyupransia Mursyanti¹, L.M. Ekawati
Purwijantiningsih¹

¹ Fakultas Teknobiologi Universitas Atmajaya Yogyakarta
mariaalintar@gmail.com

INTISARI

Tanaman pohpohan adalah salah satu tanaman di daerah Jawa Barat yang mengandung senyawa antioksidan diantaranya flavonoid dan alkaloid, beberapa vitamin, serat, dan mineral penting yaitu kalsium (Ca), besi (Fe), dan fosfor (P). Kelebihan kultur *in vitro* dalam produksi metabolit sekunder diantaranya adalah kecepatan pertumbuhan yang cepat dan material yang dibutuhkan sedikit. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui kandungan flavonoid dan alkaloid pada kalus yang berasal dari eksplan daun dengan penambahan variasi hormon kinetin dan 2,4- diklorofenoksiasetat (2,4- D) , yaitu: 0 ppm, 0,1 ppm, 0,5 ppm, dan 1 ppm. Tahapan penelitian meliputi induksi kalus dengan variasi hormon kinetin dan 2,4-D pada medium *Murashige-Skoog* (MS), pengukuran volume sel dengan metode *Packed Cell Volume* (PCV) untuk mengetahui waktu panen kalus, dan analisis fitokimia pada kalus. Ekstraksi kalus menggunakan metode refluks *cold-finger*. Analisis fitokimia dilakukan dengan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan dilanjutkan dengan uji dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). Standar yang digunakan yaitu standar kuersetin dan kuinin sulfat. Berdasarkan analisis KLT yang dilakukan, daun segar dan kalus memiliki bercak noda flavonoid dengan Rf kalus dengan variasi hormon 2,4-D 1 ppm sama dengan standar kuersetin yaitu 0,83. Pada analisis KLT alkaloid kuinin sulfat, kecuali pada daun segar, dan kalus yang diinduksi dengan kombinasi kinetin 0,1 ppm + 2,4-D 0,1 ppm ; kinetin 1 ppm + 2,4-D 0,5 ppm, muncul bercak noda alkaloid dengan Rf sampel antara 0,2-0,21 dan Rf standar kuinin sulfat 0,25. Berdasarkan hasil uji senyawa alkaloid menggunakan metode KCKT, menunjukkan puncak dengan waktu retensi standar kuinin sulfat 2,842 menit, daun segar 2,746 menit dan kalus dengan kombinasi 2,4-D 1 ppm + kinetin 1 ppm 2,616 menit. Konsentrasi senyawa metabolit sekunder kuinin sulfat dalam daun segar sebanyak 1020,08 ppm dan kalus dengan kombinasi 2,4-D 1 ppm + kinetin 1 ppm memiliki konsentrasi 145,387 ppm. Hasil uji senyawa flavonoid menggunakan metode

KCKT menunjukkan puncak standar kuersetin 3,856 menit, daun segar 2, 387, dan kalus dengan kombinasi 2,4-D 0,5 ppm 3,226. Perbedaan waktu retensi menunjukkan senyawa yang berbeda. Hal ini menunjukkan adanya metabolit sekunder yang dihasilkan oleh kalus adalah kuinin sulfat sebesar 145,387 ppm dan tidak mengandung senyawa flavonoid golongan kuersetin.

ABSTRACT

Pohpohan (*Pilea trinervia* W.) is one of the plant that growth in West Java that contains flavonoids and alkaloids as the antioxidants, many vitamins, fibers, and minerals such as calcium, iron, and phosphor. In vitro culture has the advantage to produce the secondary metabolites such as faster growth rate and need less material. This study aims to determined flavonoids and alkaloids type that produce on callus induced from leaves by variety of hormones kinetin and 2,4 dichlorophenoxy acetic acid (2,4 D) which is: 0 ppm, 0.1 ppm, 0.5 ppm, and 1 ppm. The study begins with callus initiation that induced by kinetin and 2,4 D in MS media, measurement of cell volume growth with packed cell volume (PCV) method, and flavonoid and alkaloid analysis. Callus extraction done with reflux method modification cold finger. Thin Layer Chromatography (TLC) method and High Performance Liquid Chromatography method used in flavonoids and alkaloids analysis. Quinine and quercetin is used as a comparison for the two methods. Fresh leaves and callus showed the flavonoids spot and callus combined by 2,4 D 1 ppm has the same Rf as quercetin that is 0,83 with TLC scanner. On the other hand, except for fresh leaves, callus combined by kinetin 0,1 ppm + 2,4-D 0,1 ppm; kinetin 1 ppm + 2,4-D 0,5 ppm, showed the alkaloids spot with Rf between 0,2-0,21. HPLC analysis of alkaloids showed peak with retention time quinine 2,842 minutes, fresh leaves 2,746 minutes, and callus combined by 2,4-D 1 ppm + kinetin 1 ppm 2,616 minutes. Fresh leaves contained 1020,08 ppm quinine and callus contains 145,387 ppm. HPLC analysis of flavonoids showed quercetin peak with retention time 3,856 minutes, fresh leaves 2,387 minutes, and callus combined by 2,4 D 0,5 ppm 3,226 minutes. The differences of RT occur in flavonoids analysis. The result showed that callus contains secondary metabolites such as quinine.

Keywords: pohpohan, callus, kinetin, 2,4 D, secondary metabolites, Rf, retention time, HPLC, TLC, secondary metabolites.

PENDAHULUAN

Salah satu tanaman yang memiliki antioksidan adalah tanaman pohpohan (*Pilea trinervia* W.) (Dwiyani, 2008). Tanaman pohpohan merupakan tanaman yang daunnya dapat digunakan sebagai lalapan yang memiliki cita rasa yang khas. Tanaman ini memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi serta mengandung beberapa vitamin, serat dan mineral penting yaitu kalsium (Ca), besi (Fe), dan fosfor (P) (Dwiyani, 2008).

Menurut Amalia dkk, (2006), kandungan fitokimia pada daun pohpohan adalah steroid atau triterpenoid, alkaloid dan flavonoid. Kandungan antioksidan ini biasanya diperoleh dari sintesis metabolit sekunder tanaman pohpohan. Kandungan metabolit sekunder ini disintesis dari daun segar tanaman tersebut.

Secara *in vitro*, metabolit sekunder dapat diperoleh dengan beberapa metode diantaranya kultur organ, kultur suspensi sel dan kultur kalus . Kultur *in vitro* biasanya digunakan untuk produksi metabolit sekunder karena memiliki beberapa kelebihan, diantaranya kecepatan pertumbuhan sel yang cepat serta material yang dibutuhkan sedikit (Babu dkk., 2011). Metode ini akan menghasilkan tanaman dengan sifat fisiologi dan morfologi yang sama dengan induknya. Teknik kultur *in vitro* terus dikembangkan terutama dalam penyediaan metabolit sekunder secara optimal (Singh dkk., 2010).

Untuk mengetahui kandungan fitokimia pada kalus pohpohan pada tahap awal dilakukan dengan metode ekstraksi refluks dan *cold finger*. Selanjutnya dilakukan analisis kualitatif menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) yang memiliki prinsip kerja memisahkan komponen sesuai kepolaritasannya (Putra, 2015). Analisis kuantitatif dapat dilakukan dengan

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (*High Performance Liquid Chromatography*) yang akan menganalisis senyawa tertentu berdasarkan sifat kepolarannya terhadap fase diam dan fase gerak.

METODE PENELITIAN

Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang digunakan antara lain adalah daun tanaman pohpohan yang diperoleh dari Kebun Percobaan Manoko, Lembang, Jawa Barat nodus ke tiga sampai lima. Medium induksi kalus dan kultur suspensi sel adalah medium Murashige-Skoog (MS). Hormon yang digunakan adalah kinetin dan 2,4-D. Standar senyawa yang dipakai kuinin dan kuersetin. Ekstraksi kalus menggunakan metanol. Eluen untuk KLT dan HPLC antara lain adalah larutan etil asetat, larutan asam formiat, larutan toluene, dan larutan dietilamin. Alat yang digunakan adalah *Laminar Air Flow* (LAF), *waterbath*, sentrifugasi, *shaker incubator*, plat silika gel 60 F₂₅₄, CAMAG *chamber*, CAMAG *TLC Densitometer*, dan KCKT Shimadzu, serta alat dan bahan lain sebagai penunjang penelitian.

Tahap Pelaksanaan

Induksi kalus dimulai dari sterilisasi eksplan daun. Daun pohpohan dipilih yang dalam keadaan baik, dicuci bersih, dan dimasukkan ke dalam gelas becker berisi larutan bakteriosida (Agrept 20 WP) 250 mg, fungisida (Diathane M-45) 750 mg, detergen, dan air sebanyak 250 ml. Daun direndam sambil digojog selama 15 menit. Sterilisasi eksplan kemudian dilanjutkan di dalam LAF. Daun disterilisasi menggunakan campuran larutan NaClO, aquades steril, dan tween 20.

Konsentrasi NaClO 50% selama 3 menit, 30% selama 5 menit, dan 10% selama 7 menit, selanjutnya dilakukan 3 kali pembilasan dengan aquades steril selama 3, 7, dan 10 menit. Setelah dibilas, eksplan dicelupkan pada larutan etanol 70% selama 60 detik selanjutnya dikeringkan dengan kertas saring (Putra, 2015). Setelah sterilisasi, dilakukan penanaman kalus, dan diamati pertumbuhannya. Parameter yang digunakan adalah kecepatan pembentukkan kalus, selisih berat basah kalus, dan morfologi kalus dengan *skoring* berdasarkan warna dan tekstur kalus (Andaryani, 2010 ; Karomah, 1998). Subkultur dilakukan setelah 14 hari induksi kalus.

Pengukuran pertambahan volume kalus dilakukan untuk mengetahui pertumbuhan kalus optimal agar mendapatkan hasil panen terbaik. Kalus berumur 28 hari diinisiasikan ke dalam medium cair dengan penambahan variasi hormon. Kultur kalus kemudian dimasukkan ke dalam *shaking incubator* dengan kecepatan putaran 120 rpm dan suhu 25 – 27 °C. Pengaturan cahaya dilakukan dengan penggunaan botol gelap pada medium kultur suspensi sel. Perhitungan jumlah sel dilakukan pada hari ke 0, 3, 5, 7, 9, 11, dan 13. Perhitungan jumlah sel dengan cara kultur suspensi sel diambil sebanyak 5 ml ke dalam *conicle* steril kemudian disentrifugasi selama 5 menit. Endapan yang terbentuk diukur volumenya dengan membandingkan dengan standar pengukuran. Volume yang terbaca dicatat dan dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali. Masing-masing perhitungan dilakukan secara aseptis di dalam LAF dan kemudian dilakukan inkubasi dalam *incubator shaker* kembali.

Ekstraksi kalus dilakukan dengan metode *cold finger*. Kalus usia 28 hari ditimbang kemudian dikeringkan dengan oven pada suhu 40°C selama 24 jam. Kalus kering ditimbang kemudian dipotong-potong kecil, dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang akan digunakan untuk penyarian. Hal ini dilakukan untuk mempercepat proses penyarian. Kalus kemudian direndam menggunakan metanol sebanyak 5 ml. Tabung reaksi divorteks selama lima menit dan diekstraksi dengan metode *cold-finger*. Metode *cold finger* ini dilakukan dengan memasukkan tabung reaksi yang berukuran lebih kecil yang berisikan air dingin sebagai kondensor. Tabung kemudian dipanaskan ke dalam *waterbath* selama 5 menit kemudian disaring. Filtrat yang diperoleh diuapkan pelarutnya dengan cara dituang ke cawan petri sehingga metanol dapat menguap hingga volume filtrat mencapai 0,5 ml. Ekstrak disimpan dalam tabung reaksi kecil dan ditutup rapat.

Ekstrak kalus pohpohan dielusikan pada plat KLT sebanyak 30 μ . Panjang elusi yang digunakan adalah 8 cm. Plat yang telah ditotolkan sampel dan standar dimasukkan ke dalam *chamber* yang sudah jenuh sampai elusi mencapai tanda batas atas. Penjenuhan *chamber* dibantu dengan kertas saring agar lebih cepat. Untuk melihat adanya alkaloida secara umum, plat KLT dielusikan menggunakan fase gerak toluen-etil asetat-dietilamin (70: 20:10) (John, 2012) dan untuk melihat flavonoid adalah dengan fase gerak toluena: etil asetat: asam format: air (3 : 6 : 1,5 : 0,5). Hasil plat dilanjutkan dengan TLC densitometer untuk pengukuran konsentrasi senyawa.

Ekstrak sampel yang telah disaring diinjeksikan ke kolom HPLC C-18 phase; Develosil ODS-UG-3 yang memiliki dimensi panjang 75 mm dan diameter

dalam 4.6 mm. Fase gerak yang digunakan untuk uji flavonoid adalah metanol: air (60: 40 v/v) dengan kecepatan alir 1000 ml/menit dan panjang gelombang 270 nm. Fase gerak linear yang digunakan dalam pengujian alkaloid adalah metanol: air (10: 90 v/v) selama 2 menit pertama, kemudian diteruskan dengan metanol: air (90: 10 v/v) pada menit selanjutnya dengan peningkatan konsentrasi bertahap. Kecepatan alir 1000 ml/menit dengan panjang gelombang 230 nm. Hasil dari kromatogram sampel kemudian dibandingkan dengan kromatogram standar. Penentuan komponen yang terdapat pada sampel dilihat berdasarkan waktu retensi masing-masing standar. Berdasarkan area yang diperoleh, dihitung konsentrasinya dengan menggunakan perhitungan dengan menggunakan eksternal standar, yaitu dengan membandingkan luas area komponen pada sampel dengan luas area pada standar campuran (Rahmat, 2009).

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Induksi Kalus

Penggunaan hormon tersebut akan menghasilkan pengaruh sinergisme sehingga dapat memacu daya aktivitas zat pengatur tumbuh satu sama lain. Parameter pertambahan kalus yang dilakukan pada penelitian ini antara lain kecepatan induksi kalus, pertambahan berat, dan skoring kalus. Hasil kecepatan induksi kalus dihitung dari munculnya kalus pertama pada eksplan daun (Tabel 1).

Tabel 1. Hari Terbentuknya Kalus Pada Eksplan Daun Tanaman Pohpohan (*Pilea trinervia* W.) pada Medium MS

		2,4 D (hari)				
		0 ppm	0,1 ppm	0,5 ppm	1 ppm	rata-rata
Kinetin (hari)	0 ppm	tt	5,67 ^a	10 ^a	7 ^a	7,56 ^a
	0,1 ppm	tt	8,67 ^a	10,3 ^a	10,67 ^a	9,89 ^a

	0,5 ppm	tt	5,67 ^a	10 ^a	10,67 ^a	8,78 ^a
	1 ppm	tt	6,3 ^a	7 ^a	10 ^a	7,78 ^a
	rata-rata	tt	6,583 ^a	9,33 ^a	9,58 ^a	

Keterangan: tt = tidak terbentuk kalus, ditandai dengan *browning* dan kematian eksplan; angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom dan baris yang sama menunjukkan tidak beda nyata dengan tingkat kepercayaan 95%.

Pembentukan kalus diawali dengan adanya pelengkungan daun yang kemudian terjadi pembelahan sel-sel khususnya pada bagian pinggir bekas irisan. Eksplan tanpa ZPT dan 2,4 D tidak terbentuk kalus. Hal ini sesuai dengan pernyataan Gati dan Mariska (1992) dalam Rahayu dkk. (2003), 2,4-D efektif untuk memacu pertumbuhan kalus karena aktivitas dediferensiasi yang tinggi sehingga dapat menekan organogenesis dan menjaga pertumbuhan kalus.

Parameter pengaruh variasi konsentrasi yang lain adalah pertumbuhan kalus yang dilihat dari pertambahan berat kalus dari subkultur pertama yaitu 14 hari setelah induksi sampai pemanenan yaitu hari ke-28. Selisih berat kalus akan menunjukkan kecepatan dari pertambahan dan pertumbuhan biomassa kalus tersebut. Pertumbuhan kalus paling besar akan menunjukkan kecepatan pertumbuhan kalus yang terbaik (Tabel 2).

Tabel 2. Pertumbuhan Kalus Pada Eksplan Daun Tanaman Pohpohan (*Pilea trinervia* W.) pada Medium MS Umur 28 Hari Berdasarkan Pertambahan Berat Basah Kalus

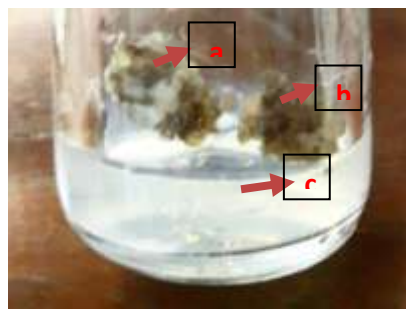
		2,4 D (ppm)				
		0	0.1	0.5	1	Rata-rata
Kinetin (ppm)	0	tt	0.49867 ^a	1.03300 ^a	0.64700 ^a	0.72622 ^a
	0.1	tt	0.73667 ^a	0.84333 ^a	0.83000 ^a	0.80333 ^a
	0.5	tt	0.67167 ^a	1.28667 ^a	1.02467 ^a	0.99433 ^a
	1	tt	0.90767 ^a	0.82200 ^a	1.20600 ^a	0.97856 ^a
	Rata-rata	tt	0.70367 ^a	0.99725 ^a	0.92692 ^a	

Keterangan : tt = tidak terbentuk kalus, ditandai dengan *browning* dan kematian eksplan; angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom dan baris

yang sama menunjukkan tidak beda nyata dengan tingkat kepercayaan 95%.

Berdasarkan tabel hasil tersebut, selisih paling besar berat paling besar terdapat pada variasi konsentrasi kinetin dan 2,4 D masing-masing 0,5 ppm sebesar 1,28667 gr. Hasil terbaik dari hormon 2,4 D ada pada penambahan sebesar 0,5 ppm, sedangkan pada hormon kinetin ada pada variasi konsentrasi 0,5 ppm. Berdasarkan hasil analisis Anava, berat basah kalus tidak menunjukkan hasil yang beda nyata. Hasil ini menunjukkan bahwa variasi konsentrasi yang digunakan tidak mempengaruhi hasil berat basah kalus umur 28 hari. Rahayu dkk. (2003), menyatakan bahwa berat basah yang dihasilkan sangat bergantung pada kecepatan sel-sel eksplan untuk membelah diri, memperbanyak diri, dan akhirnya membesarkan kalus.

Secara morfologi kalus membentuk warna dan tekstur tertentu. Perbedaan tekstur kalus dipengaruhi oleh jenis tanaman yang digunakan, komposisi nutrisi yang terdapat dalam medium, ZPT dan kondisi lingkungan kultur. Tekstur kalus dibedakan menjadi kalus *non-friable* yang merupakan kalus kompak yang berasal dari sel yang kuat dan struktur *friable* yang merupakan tekstur kalus yang mudah lepas dan meremah (Gambar 1).



Gambar 1. Kalus pohpohan (*Pilea trinervia* W.) umur 14 hari pada media MS; (a) kalus meremah *friable*; (b) kalus kompak ; (c) medium MS + hormon (sumber : dokumentasi pribadi)

Berdasarkan tabel hasil (Tabel 3), variasi konsentrasi kinetin 0,5 ppm dan 2,4 D 0,5 ppm memiliki hasil terbaik dengan nilai *skoring* 3,67. Hal ini berarti rata-rata kalus yang terbentuk berwarna hijau kecokelatan dengan tekstur kompak bernodul sampai dengan memiliki warna putih kekuningan dengan tekstur *friable* yang mudah terlepas. Berdasarkan hasil analisis Anava, *skoring* penampakan kalus menunjukkan hasil yang beda nyata.

Tabel 3. *Skoring* morfologi kalus umur 28 hari berdasarkan warna dan tekstur kalus

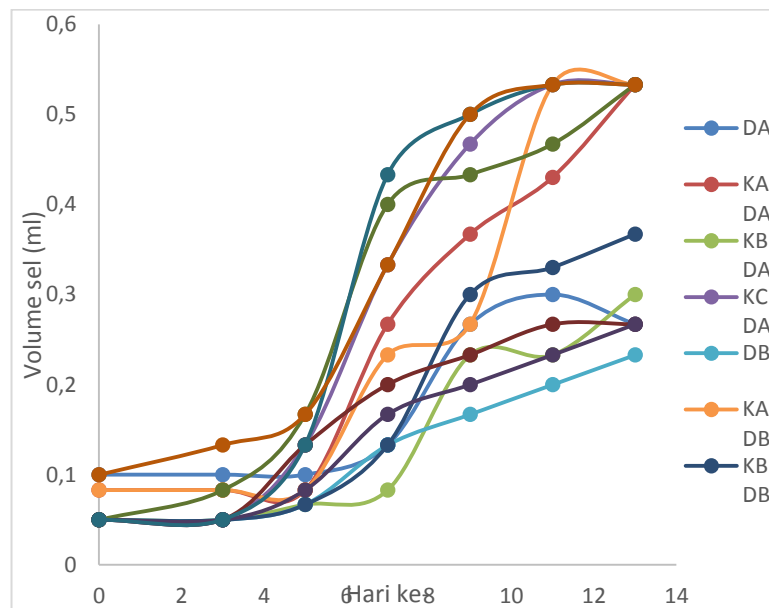
		2,4 D (ppm)				
		0	0.1	0.5	1	rata-rata
Kinetin (ppm)	0	tt	1 ^{ab}	2 ^{abcd}	1.67 ^{abc}	1.17 ^a
	0.1	tt	2 ^{abcd}	2.33 ^{bcd}	3.33 ^{cd}	1.92 ^a
	0.5	tt	1 ^{ab}	3.67 ^d	2 ^{abcd}	1.67 ^a
	1	tt	1.33 ^{ab}	1 ^{ab}	2 ^{abcd}	1.08 ^a
	rata-rata	tt	1.33 ^b	2.25 ^c	2.25 ^c	

Keterangan : tt = tidak terbentuk kalus, ditandai dengan *browning* dan kematian eksplan; angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom dan baris yang sama menunjukkan tidak beda nyata dengan tingkat kepercayaan 95%.

Kalus terbaik berwarna putih kehijauan dan bertekstur meremah, disebut kalus embriogenik yang berkorelasi dengan kecepatan tumbuh sel sehingga produksi metabolit sekunder tertentu dapat segera dicapai. Menurut Indrianto 2002, inisiasi kalus embriogenik terjadi sebagai respon stress akibat konsentrasi auksin yang tinggi. Cara mendapatkan kalus meremah selain dengan meningkatkan auksin dapat dengan cara melakukan subkultur berulang (Yelnitis, 2012; Mahadi 2016), dan dengan menambahkan senyawa ZPT lain maupun senyawa lain seperti biotin dan thidiazuron (Yelnitis, 2012; Guo dkk., 2011).

B. Pola Pertumbuhan Sel dengan Metode Kultur Suspensi Sel

Salah satu uji pertumbuhan sel adalah dengan *Packed Cell Volume*, yaitu perhitungan banyaknya sel yang termampatkan dalam satu tempat dengan satuan ml. Fase- fase pertumbuhan kalus dapat dilihat berdasarkan hasil pengukuran volume sel (Gambar 2).



Gambar 2. Pola pertumbuhan kalus pohpohan pada medium MS cair selama 14 hari

Keterangan : DA = kinetin 0 ppm + 2,4 D 0,1 ppm, KADA = kinetin 0,1 ppm + 2,4 D 0,1 ppm, KBDA = kinetin 0,5 ppm + 2,4 D 0,1 ppm, KCDA = kinetin 1 ppm + 2,4 D 0 ppm, DB= kinetin 0 ppm + 2,4 D 0,5 ppm, KADB= kinetin 0,1 ppm + 2,4 D 0,5 ppm, KBDB= kinetin 0,5 ppm + 2,4 D 0,5 ppm, KBDC= kinetin 1 ppm + 2,4 D 0,5 ppm, DC= kinetin 0 ppm + 2,4 D 1 ppm, KADC= kinetin 0,1 ppm + 2,4 D = 1 ppm, KBDC = kinetin 0,5 ppm + 2,4 D 1 ppm, KCDC = kinetin 1 ppm + 2,4 D 1 ppm.

Berdasarkan hasil pengukuran volume sel dapat dilihat bahwa rata-rata fase awal (*lag phase*) terjadi pada hari ke-0 sampai ke 3, dilanjutkan fase eksponensial pada hari ke 3 sampai hari ke 7. Fase linier adalah fase dimana terjadi peningkatan jumlah volume namun tidak signifikan terjadi pada hari ke 7-

11. Pada hari ke 13 tidak terjadi peningkatan volume sel pada eksplan yang menunjukkan bahwa sel tersebut sudah berhenti membelah dan mencapai fase stasioner yang harus dilanjutkan dengan kegiatan subkultur. Adanya variasi hormon menyebabkan adanya peningkatan jumlah sel dan hasil terbaik adalah pada konsentrasi kinetin 1 ppm + 2,4 D 0,5 ppm. Hal ini ditunjukkan dengan adanya peningkatan volume sel yang signifikan pada fase eksponensial (hari ke-3) dan mencapai jumlah sel terbanyak pada akhir fase linier.

C. Analisis Kandungan Metabolit Sekunder

Berdasarkan hasil densitometri, kuersetin merupakan salah satu senyawa flavonol yang memiliki Rf max 0,83, dari standar tersebut, sampel daun segar dan variasi konsentrasi kinetin 0,5 ppm dan 2,4 D 1 ppm, memiliki Rf max yang sama. Berdasarkan hasil skrining KCKT, kalus dan daun segar tidak terdeteksi mengandung senyawa flavonoid golongan kuersetin. Hal ini ditunjukkan dengan hasil waktu retensi yang berbeda dengan standar kuersetin yang menunjukkan waktu 3,856. Waktu retensi kalus 3,226 dan daun segar 2,387. Namun dari waktu retensi yang muncul puncak, menunjukkan bahwa kalus mengandung flavonoid jenis yang lain

Berdasarkan hasil densitometri, kuinin memiliki Rf max 0,25, dari standar tersebut, daun segar dan kalus tidak memiliki Rf yang sama. Namun, memiliki Rf max yang berkisar antara 0,17- 0,21. Dari hasil skrining KCKT, waktu retensi sampel kalus dengan variasi ZPT kin 0 ppm + 2,4 D 0,1 ppm dan daun segar tidak berbeda jauh dengan standar kuinin yang menunjukkan waktu 2,842. Waktu retensi daun segar 2,746 dan kalus 2,616. Hasil ini menunjukkan bahwa senyawa

yang dikandung merupakan kuinin. Konsentrasi kuinin pada daun segar sebesar 102 ppm, dan konsentrasi kuersetin pada sampel sampel kalus dengan variasi ZPT kin 0 ppm + 2,4 D 0,1 ppm sebesar 14,53 ppm.

Adanya konsentrasi kuinin dalam kalus dengan kombinasi kinetin 0 ppm + 2,4 D 0,1 ppm yang rendah dapat disebabkan oleh konsentrasi yang kurang sehingga hanya mampu meningkatkan pertumbuhan kalus. Hal ini sesuai dengan Lindsey dan Yeoman (1983) bahwa terhambatnya pertumbuhan pada kultur yang menghasilkan metabolit sekunder disebabkan adanya kompetisi antara metabolisme primer dan sekunder untuk mendapatkan nutrisi.

Rendahnya konsentrasi metabolit sekunder pada penelitian ini juga dipengaruhi oleh waktu pemanenan. Pemanenan dilakukan pada fase linier dan sel masih menggunakan medium untuk metabolisme primer dan untuk memacu pertumbuhan sel, sehingga produksi metabolit sekunder masih sedikit. Menurut Darwati (2007), pada umumnya produksi metabolit sekunder terjadi pada fase akhir stasioner. Peningkatan produksi metabolit sekunder ini disebabkan oleh adanya peningkatan vakuola sel yang digunakan untuk akumulasi (Smith, 2000 *dalam* Darwati, 2007).

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan maka dapat disimpulkan bahwa,

1. Kombinasi kinetin 0,5 ppm + 2,4-D 0,1 ppm memberikan kecenderungan terbaik untuk kecepatan pembentukan kalus, sedangkan kombinasi hormon

kinetin 0,5 ppm + 2,4-D 0,5 ppm memberikan kecenderungan terbaik untuk pertumbuhan dan morfologi kalus.

2. Pertumbuhan kalus terbaik didapatkan dari kombinasi kinetin 1 ppm + 2,4-D 0,5 ppm yang ditunjukkan dengan terjadinya fase awal (*lag phase*) pada hari ke 0 sampai 3, fase eksponensial pada hari ke 3 sampai hari ke 5, fase linier pada hari ke 5 sampai 11 kemudian masuk ke dalam fase stasioner pada hari ke 11 sampai 13.
3. Kalus tanaman pohpohan (*Pilea trinervia* W.) mengandung alkaloid golongan kuinin dengan kadar 145,39 ppm dan tidak mengandung flavonoid golongan kuersetin.

SARAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, saran yang dapat diajukan adalah:

1. Perlu dilakukannya optimasi kultur suspensi sel dengan penambahan ZPT maupun senyawa penginduksi lainnya agar hasil kalus yang didapat lebih optimal.
2. Perlu dilakukannya optimasi konsentrasi ZPT dan penambahan senyawa lain agar kalus yang didapat merupakan kalus embriogenik.
3. Perlu dilakukannya fotoperiode pada masa inkubasi kalus.
4. Perlu dilakukannya analisis flavonoid dan alkaloid dengan beberapa standar yang lain.

5. Perlu dilakukannya pemanenan kalus pada fase stasioner untuk produksi metabolit sekunder.
6. Perlu dilakukannya subkultur dengan penambahan thidiazuron pada medium MS.

DAFTAR PUSTAKA

- Darwati, I. 2007. Pengaruh auksin, precursor, dan osmotikum terhadap kandungan metabolit sekunder kalus purwoceng (*Pimpinella prutjan* Molk.). *Thesis Pascasarjana IPB*, Bogor.
- Dwiyani, R. 2008. Identifikasi golongan sentawa antioksidan pada daun pohpohan (*Pilea trinervia*). *Skripsi*. FMIPA IPB, Bogor.
- Guo, B. Abbasi, Zeb, LL Xu, dan Wei, Y.H. 2011. Thidiazuron: a multidimensional plant growth regulator. *Afr.J. Biotechnology* 10(45): 8984-9000.
- Indianto, A. 2002. *Kultur Jaringan Tumbuhan*. Fakultas Biologi UGM, Yogyakarta.
- Lindsey, K. dan Yeoman, M. 1983. Novel experimental systems for studying the production of secondary metabolite by plant tissue culture. Dalam: *Plant Biotechnology*. Manthell, S.H. dan Smith. Cambridge University Press, New York.
- Mahadi, I., Wan S., dan Yeni S. 2016. Induksi kalus jeruk kasturi (*Citrus microcarpa*) menggunakan hormone 2,4-D dan BAP dengan metode *in vitro*. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia (JIPI)* 21 (2): 84-89.
- Putra, V.G. 2015. Pengaruh Kinetin dan Asam 2,4 Diklorofenoksiasetat Terhadap Kandungan Metabolit Sekunder Kalus Daun Pohpohan (*Pilea trinervia* Wright). *Skripsi*. Universitas Atmajaya Yogyakarta, Yogyakarta.
- Rahayu, B., Solichatun, dan Endang A. 2003. Pengaruh asam 2,4-diklorofenoksiasetat (2,4-D) terhadap pembentukan dan pertumbuhan kalus serta kandungan flavonoid kultur kalus *Acalypha indica* L. *Biofarmasi* 1(1): 1-6.

Rahmat , H . 2009. Identifikasi senyawa flavonoid pada sayuran indigenous Jawa Barat . *Skripsi* . Institut Pertanian Bogor, Bogor.

Singh,R.S. 2010. *Plant Diseases*. Oxford and IBH Publishing, New Delhi.

Yelnititis. 2012. Pembentukan kalus remah dari eksplan daun ramin (*Gonystylus bancanus* (Miq) Kurz.). *Jurnal Pemuliaan Tanaman Hutan*. 6 (3): 181-194.