

I. PENDAHULUAN

A. Latar belakang

Pada era globalisasi, manusia semakin rentan terpapar oleh radikal bebas. Sumber radikal bebas dapat berasal dari asap kendaraan bermotor, asap pabrik, radiasi, makanan, dan juga proses oksidasi dalam tubuh. Radikal bebas dapat memicu timbulnya berbagai penyakit degeneratif. Beberapa penyakit degeneratif yang dipicu oleh radikal bebas antara lain kanker, jantung, serta diabetes. Melihat semakin rentannya manusia terserang penyakit degeneratif, dibutuhkan senyawa antioksidan yang dapat menangkap radikal bebas tersebut, sehingga tidak terjadi induksi penyakit (Kikuzaki dkk., 2012).

Antioksidan merupakan senyawa yang mampu menangkal atau meredam dampak negatif dari oksidan dalam tubuh dengan berfungsi sebagai donor proton. Antioksidan bekerja dengan cara mendonorkan satu protonnya kepada senyawa radikal bebas yang bersifat oksidan sehingga senyawa oksidan tersebut dapat dihambat (Winarsi, 2007). Keseimbangan oksidan dan antioksidan sangat penting karena berkaitan dengan imunitas tubuh terutama untuk menjaga integritas dan berfungsinya membran lipid, protein sel, asam nukleat, serta mengontrol transduksi sinyal dan ekspresi gen dalam sel imun.

Antioksidan menurut Prabantini (2010), dapat ditemukan dari sumber-sumber antioksidan yakni antioksidan sintetik dan antioksidan alami. Antioksidan sintetik merupakan antioksidan yang diperoleh dari hasil sintesis melalui reaksi kimia, antioksidan alami merupakan antioksidan hasil ekstraksi dari bahan alami.

Resiko penggunaan produk sintetik telah mendorong kesadaran manusia modern untuk beralih ke produk alami, salah satu diantaranya dalam hal antioksidan alami.

Salah satu sumber antioksidan alami yang biasa dikonsumsi selain dari buah adalah teh. Teh menurut Rohdiana (2001), memiliki antioksidan golongan polifenol yakni katekin yang memiliki empat turunan yakni epikatekin (EC), epikatekin galat (ECG), epigalokatekin (EGC), dan epigalokatekin galat (EGCG). Menurut Rohdiana (2001), epigalokatekin galat (EGCG) dan epikatekin galat (ECG) merupakan senyawa utama katekin dalam teh. Epikatekin galat (ECG) merupakan salah satu turunan katekin yang memiliki daya antioksidan terbesar kedua selain epigalokatekin galat (EGCG). Oleh karena itu, epikatekin galat ini merupakan salah satu sumber antioksidan yang potensial.

Kadar katekin pada teh (*Camelia sinensis* L.) menurut Balittri (2013) adalah 13,5 – 31 % dari berat kering daun teh segar dengan komposisi epigalokatekin galat adalah sekitar 5 – 14 % serta epikatekin galat sekitar 2 – 4 %. Senyawa epigalokatekin galat dan epikatekin galat ini merupakan derivat dari katekin yang merupakan salah satu substansi fenol golongan flavanol (Alamsyah, 2006). Selain senyawa fenol, Alamsyah (2006) juga menyebutkan bahwa teh memiliki kandungan lain seperti substansi penyebab aroma yakni klorofil, kaotenoid, dan senyawa volatil, substansi bukan fenol seperti karbohidrat, substansi pektin, alkaloid, protein, vitamin, serta mineral.

Dengan berkembangnya teknologi dan ilmu pengetahuan, kandungan zat aktif pada suatu sediaan dapat dimaksimalkan. Salah satu upaya yang dapat digunakan adalah dengan elisitasi pada kultur suspensi sel (Hutami, 2009). Daun

teh (*Camellia sinensis* L.) yang dikultur pada medium secara *in vitro* akan tumbuh kalus yang merupakan bahan utama elisitasi dalam kultur suspensi sel.

Kalus merupakan kumpulan sel *amorphous*, tidak terorganisasi, dan belum berdiferensiasi yang terbentuk akibat luka sebagai respon perlindungan untuk menutup jaringan luka (Heryanto, 2014). Kalus akan tumbuh pada area irisan atau luka pada eksplan (Hendaryono dan Wijayanni, 1994). Menurut Hartman dkk. (1990), kalus dapat diinisiasi dari bagian serta organ-organ tanaman, namun masing-masing organ akan memberikan kecepatan pembelahan sel yang berbeda sehingga akan memengaruhi kecepatan pertumbuhan kalus yang berbeda juga. Kalus yang digunakan dalam metode kultur suspensi menurut Zulkarnain (2009), merupakan kalus remah yang ditumbuhkan pada medium cair yang diberi aerasi.

Pertumbuhan kalus dapat dimanipulasi untuk meningkatkan produksi metabolit sekunder. Salah satu metodenya adalah dengan penambahan elisitor. Elisitor merupakan agen aktif yang akan memicu terbentuknya metabolit sekunder dengan menginduksi respon perlindungan diri tanaman (Caldentey dan Bars, 2002). Salah satu elisitor yang dapat digunakan adalah *Saccharomyces cerevisiae* dan kitosan yang dapat meningkatkan aktivitas enzim *phenylalanine ammonia lyase* (PAL) (Wijaya dkk., 2009). Oleh karena itu, penelitian ini menggunakan elisitor bubuk *Saccharomyces cerevisiae* dan kitosan untuk meningkatkan produksi epikatekin galat pada kultur suspensi sel daun teh (*Camellia sinensis* L.).

Penggunaan elisitor bertujuan sebagai induktor dalam meningkatkan produksi metabolit sekunder dengan cara menstimulasi pembentukan senyawa fenol (epikatekin galat) (Junaira dkk., 2014; Purwianingsih dan Hamdiyati, 2013).

Saccharomyces cerevisiae digunakan sebagai elisitor karena memiliki kelebihan yakni mudah diperoleh, siklus hidupnya pendek, tidak bersifat patogen bagi manusia dan dapat tumbuh pada pH rendah (Sitinjau dkk., 2000). Kitosan juga dapat digunakan sebagai elisitor karena sifatnya yang aman bagi tubuh manusia (Mahatmanti dkk., 2010). Selain itu, elisitor *Saccharomyces cerevisiae* serta kitosan memiliki aktivitas peningkatan enzim *Phenylalanin Ammonia Lyase* (PAL) yang merupakan enzim yang bekerja pada proses biosintesis epigalokatekin galat (Srisornkompon dkk., 2014; Abraham dkk., 2011).

B. Keaslian Penelitian

Seran dkk. (2016) melakukan penelitian untuk memproduksi embrio somatik dari kalus daun teh (*Camellia sinensis* L.). Perlakuan yang dilakukan adalah variasi konsentrasi medium Murashige Skoog (MS) serta variasi penggunaan ZPT berupa BAP, NAA, serta ABA. Hasil terbaik yakni didapatkan kalus remah pada perlakuan medium MS penambahan ZPT BAP dan NAA dengan konsentrasi masing-masing ZPT adalah 1 ppm.

Penelitian yang dilakukan oleh Purwianingsih dan Hamdiyati (2013), menggunakan elisitor ragi *Saccharomyces cerevisiae* untuk meningkatkan kandungan bioaktif kuinon kalus *Morinda citrifolia* L. Perlakuan elisitor yang digunakan adalah sebesar 2,5 %, 5 %, dan 7,5 % dengan pemanenan kuinon hasil elisitasi pada hari ke-0, 2, dan 4. Perlakuan terbaik menghasilkan kuinon tertinggi adalah pada perlakuan 2,5 % dan 5 % *Saccharomyces cerevisiae* dengan waktu pemanenan optimal adalah pada hari ke-2.

Penelitian lain yang menggunakan ekstrak *Saccharomyces cerevisiae* sebagai elisitor adalah penelitian yang dilakukan oleh Sitinjak dkk. (2000). Percobaan yang dilakukan bertujuan untuk melihat efek ekstrak *Saccharomyces cerevisiae* terhadap produksi gossipol yang merupakan senyawa fenol-terpen pada kultur kalus *Gossypium hirsutum* L. Percobaan dilakukan dengan menggunakan ekstrak *Saccharomyces cerevisiae* dengan konsentrasi 0,5; 1; dan 2,5 %. Perlakuan yang dapat meningkatkan kandungan gossipol paling maksimal adalah pada konsentrasi 0,5 % ($\frac{0,05\%}{2,5\text{ ml}}$) yakni sebesar 13,764 % hingga 207,345 %.

Penelitian yang dilakukan oleh Arif (2011) menggunakan ekstrak khamir untuk meningkatkan produksi senyawa solasodin dalam kultur kalus *Solanum khasianum* CLARKE. Percobaan dilakukan dengan menggunakan variasi konsentrasi ekstrak khamir 0, 0,25, 0,5, dan 1 %. Perlakuan paling maksimal untuk meningkatkan produksi senyawa solasodin adalah 0,25 % dengan produksi solasodin sebesar 0,25 mg/g.

Penelitian yang dilakukan oleh Sitinjak dkk. (2000) juga meneliti waktu pemanenan elisitor *Saccharomyces cerevisiae* dengan menggunakan medium *glucose yeast extract* untuk mendapatkan kerapatan sel yang optimum. Penentuan kurva tumbuh *Saccharomyces cerevisiae* dilakukan dengan menggambarkan hubungan antara jumlah sel dengan waktu inkubasi. Perhitungan jumlah sel pada penelitian tersebut menggunakan metode *total plate count*. Hasil yang didapat adalah bahan elisitor *Saccharomyces cerevisiae* dipanen pada fase stasioner dengan waktu panen pada jam ke-17 hingga jam ke-24.

Penelitian menggunakan kitosan sebagai elisitor untuk meningkatkan senyawa fenol telah dilakukan oleh Srisornkompon dkk. (2014). Penelitian tersebut bertujuan untuk meningkatkan senyawa fenol pada daun teh (*Camellia sinensis* L.) dengan *pre-* dan *post-treatment* dengan melihat aktivitas *phenylalanine ammonia lyase* (PAL) yang merupakan enzim kunci pembentuk katekin. Kitosan yang digunakan disemprot pada daun teh dengan konsentrasi 0, 25, 50, dan 100 mg/L. Perlakuan kitosan terbaik adalah 25 mg/L ($\frac{0,025 \text{ mg}}{2,5 \text{ ml}}$) dengan kenaikan konsentrasi katekin sebesar 9 % selama 5 hari dan 16 % selama 6 minggu.

Penelitian lain yang menggunakan kitosan sebagai bahan elisitor dilakukan oleh Notsu dkk. (1994). Penelitian yang dilakukan bertujuan untuk meningkatkan aktivitas enzim *phenylalanin ammonia lyase* (PAL) serta lignifikasi pada kalus beras yang diberikan perlakuan kitin, kitosan, dan derivatnya. Perlakuan elisitasi yang dilakukan adalah 0,25 %, 0,5 %, dan 1 % (b/v) kitosan yang diberikan pada kalus beras. Hasil yang paling maksimal dalam meningkatkan aktivitas enzim PAL adalah 0,25 % kitosan dengan aktivitas PAL $10,3 \pm 0,4 \mu\text{kat/kg protein}$.

C. Rumusan Masalah

1. Bagaimana bentuk dan warna kalus hasil induksi eksplan daun teh *C. sinensis* L. pada medium Murashige dan Skoog dengan penambahan hormon BAP 1 ppm dan NAA 1 ppm?
2. Kapan waktu optimal *S. cerevisiae* dapat dipanen sehingga dapat digunakan sebagai bahan elisitor?

3. Apakah elisitor bubuk *S. cerevisiae* dan kitosan dapat meningkatkan total fenolik, aktivitas antioksidan, dan kadar epikatekin galat pada kultur suspensi daun teh?

D. Tujuan Penelitian

1. Mengetahui bentuk dan warna kalus daun teh *C. sinensis* L. pada medium Murashige dan Skoog dengan penambahan hormon BAP 1 ppm dan NAA 1 ppm.
2. Mengetahui waktu optimal untuk memanen *S. cerevisiae*, sehingga dapat digunakan sebagai bahan elisitor.
3. Mengetahui efek kombinasi elisitor bubuk *S. cerevisiae* dan kitosan meningkatkan total fenolik, aktivitas antioksidan, dan kadar epikatekin galat pada kultur suspensi daun teh.

E. Manfaat Penelitian

Hasil dari penelitian ini secara praktis diharapkan dapat memperoleh metode elisitasi terbaik untuk meningkatkan metabolit sekunder pada teh sehingga metode dapat digunakan dalam bidang industri serta bidang kesehatan. Penelitian yang dilakukan juga diharapkan dapat digunakan sebagai referensi penelitian yang menggunakan subjek teh terkhusus dalam peningkatan metabolit sekunder pada teh.