

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Tanaman Teh (*Camellia sinensis* L.)

Teh (*C. sinensis* L.) merupakan tanaman tahunan yang banyak tersebar di daerah Asia Tenggara, India, Cina Selatan, Laos, Muangthai Utara, serta Burma. Menurut Balitbangtan (2013), tanaman *C. Sinensis* L. memiliki dua varietas yakni *C. sinensis* var. *sinensis* dan *C. sinensis* var. *assamica*. Tanaman teh varietas *sinensis* memiliki ciri tipe semak dengan daun kecil dan tahan terhadap cuaca dingin dan biasanya digunakan sebagai bahan pembuatan teh hijau. Kelompok varietas *assamica* memiliki ciri tipe perpokohonan tinggi dengan daun lebar dan kurang tahan terhadap cuaca dingin yang banyak ditanam di Indonesia serta cocok untuk pembuatan teh hitam. Menurut Sharma dan Venkataramani (1974) teh diklasifikasikan sebagai berikut:

Kerajaan	: <i>Plante</i>
Divisi	: <i>Spermatophyta</i>
Subdivisi	: <i>Angiospermae</i>
Kelas	: <i>Dicotyledoneae</i>
Bangsa	: <i>Guttiferales</i>
Suku	: <i>Theaceae</i>
Marga	: <i>Camellia</i>
Jenis	: <i>Camellia sinensis</i> L.

Teh telah banyak dikonsumsi manusia sejak daun teh diketahui mengandung banyak komponen yang bermanfaat. Salah satu komponen yang bermanfaat dalam teh menurut Balitbangtan (2013) adalah tanin terutama katekin, kafein, asam amino, dan beberapa macam vitamin. Tanin merupakan senyawa tidak

berwarna yang merupakan komponen penting dalam daun teh. Tanin atau yang lebih dikenal katekin dalam teh merupakan turunan dari asam galat yang merupakan senyawa kompleks yang tersusun dari senyawa-senyawa katekin, epikatekin, epikatekin galat, epigalokatekin, dan epigalokatekin galat. Katekin pada teh memiliki sifat pahit dan sepat pada seduhan teh yang merupakan sumber rasa sepat pada minuman teh.

Berdasarkan kandungan kimia di dalam daun teh, khasiat yang dimiliki daun teh dapat digunakan sebagai antioksidan yang dapat mencegah pembentukan radikal bebas dalam tubuh, melindungi lemak dalam plasma darah, melindungi kerusakan minyak dan lemak dalam makanan, antimutasi gen. Selain itu katekin pada teh juga bersifat antitumor yang akan menekan pertumbuhan sel tumor serta menekan pembentukan tumor, antikanker payudara, antikolesterol, antibakteri, deodoran, antivirus (influenza dan papiloma); antidiabetes; serta antihipertensi. Senyawa metabolit sekunder pada teh juga dapat menghambat aktivitas enzim (seperti enzim angiotensin I, amilase, sukrase, maltase, enzim glukosil yang merupakan enzim pemicu HIV, dan enzim tirosinase) (Balitbangtan, 2013).

Tanaman teh tua dan muda memiliki beberapa perbedaan selain dari ukuran daun yang lebih besar untuk daun teh tua. Perbedaan morfologi tanaman teh tua yang dibandingkan dengan tanaman teh berusia muda. Menurut Balitbangtan (2013) dapat dilihat pada Tabel 1. Bentuk tanaman teh dapat dilihat pada Gambar 1. Daun teh memiliki pembagian urutan daun dari kuncup yang menentukan juga kualitas daun teh tersebut (Balitbangtan, 2013). Pembagian struktur daun teh dari kuncup hingga daun ke-5 dapat dilihat pada Gambar 2.

Tabel 1. Ciri-ciri daun muda dan daun tua teh (Balitbangtan, 2013)

Karakter Morfologi	Daun Muda	Daun Tua
Bentuk	Lanset	Lanset
Warna	Merah, hijau muda	Kemerahan, hijau kekuningan
Panjang (cm)	4 – 11,7	8,5 – 16
Lebar (cm)	2,2 – 5,5	3,2 – 6,5
Panjang tangkai (cm)	0,2 – 0,4	0,3 – 1
Tepi	Bergerigi	Bergerigi
Ujung	Tumpul	Tumpul
Bentuk pangkal	Runcing	Runcing
Panjang peko (cm)	1,5 – 4,5	-
Inter node (cm)	1 – 4,5	-

Gambar 1. Tanaman *C. sinensis* L. (Balitbangtan, 2013)Gambar 2. Pembagian Struktur Daun *C. sinensis* L. (Tai dkk., 2015). Huruf B merupakan pucuk, L1 merupakan daun pertama, L2 merupakan daun ke-2, L3 merupakan daun ke-3, L4 merupakan daun ke-4, dan L5 merupakan daun ke-5

B. Antioksidan Serta Manfaatnya

Menurut Winarsi (2007), antioksidan merupakan senyawa yang mampu menangkal atau meredam dampak negatif oksidan dalam tubuh. Antioksidan bekerja dengan cara mendonorkan protonnya kepada senyawa-senyawa yang bersifat oksidan sehingga senyawa oksidan yang tidak terkontrol untuk mencari pasangannya menjadi lebih netral (dapat terhambat). Menurut Winarsi (2007), antioksidan dapat dikelompokkan menjadi 2 yakni enzimatis dan non enzimatis. Antioksidan enzimatis contohnya adalah katalase, glutathion peroksidase. Antioksidan non-enzimatis masih dibagi lagi menjadi 2 kelompok yakni:

- a. Antioksidan larut lemak seperti tokoferol, keratenoid, flavonoid, quinon, dan bilirubin
- b. Antioksidan larut air seperti asam askorbat, asam urat, protein pengikat logam, dan protein pengikat heme.

Berdasarkan mekanisme kerjanya menurut McCord (1979); Aebi (1984); dan Urisini (1995), antioksidan dapat digolongkan menjadi:

- a. Antioksidan primer

Antioksidan primer juga sering disebut antioksidan enzimatis. Suatu senyawa dapat dikatakan sebagai antioksidan primer apabila dapat memberikan atom hidrogen secara cepat kepada senyawa radikal bebas kemudian radikal antioksidan yang terbentuk segera berubah menjadi senyawa yang lebih stabil. Antioksidan primer bekerja dengan mencegah pembentukan senyawa radikal bebas baru atau mengubah radikal bebas yang terbentuk menjadi molekul yang kurang reaktif.

b. Antioksidan sekunder

Antioksidan sekunder disebut juga antioksidan eksogenus atau non enzimatis. Antioksidan dalam kelompok ini disebut dengan sistem pertahanan preventif. Antioksidan non-enzimatis dapat berupa komponen non-nutrisi dan kelompok nutrisi dari sayuran dan buah-buahan. Kerja sistem antioksidan ini yakni dengan cara memotong reaksi oksidasi berantai dari radikal bebas atau dengan cara menangkapnya. Akibatnya radikal bebas tidak akan bereaksi dengan komponen seluler. Ketika jumlah radikal bebas berlebihan, kadar antioksidan non-enzimatis yang dapat diamati dalam cairan biologis yang menurun.

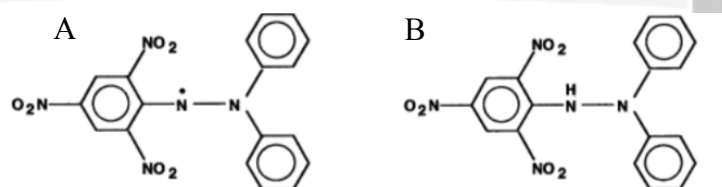
c. Antioksidan tersier

Antioksidan tersier meliputi sistem enzim DNA-repair dan metionin sulfoksida reduktase. Enzim-enzim ini berfungsi dalam perbaikan biomolekuler yang rusak akibat reaktivitas radikal bebas. Kerusakan DNA yang terinduksi senyawa radikal bebas dicirikan oleh rusaknya single atau double strand, baik gugus non basa maupun basa.

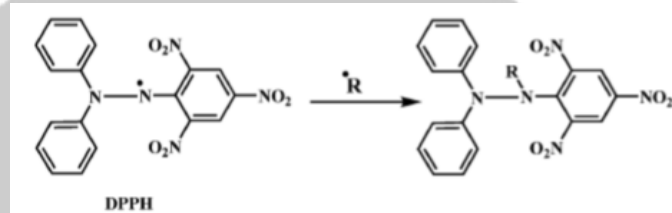
Menurut Somantri dan Tanti (2011) antioksidan memiliki fungsi untuk melindungi tubuh dari efek buruk radikal bebas. Radikal bebas merupakan atom, molekul ataupun ion-ion yang bebas (memiliki elektron bebas) yang bersifat sangat reaktif terhadap molekul lainnya (Lu dkk., 2010). Radikal bebas ini dapat mempercepat penyakit degeneratif seperti mempercepat pertumbuhan sel-sel kanker dan menimbulkan masalah-masalah kardiovaskular (jantung dan pembuluh darah). Dalam sistem tubuh, radikal bebas biasanya dihasilkan dari molekul

Gambar 3. Struktur DPPH (Molyneux, 2004). A: DPPH radikal

Reduksi atau perubahan warna tersebut selanjutnya nilai absorbansi sinar tampak menggunakan spektrofotometer (dkk. (2009) dan Molyneux (2004), serapan cahaya yang kuat pada gelombang 517 nm karena adanya elektron tidak berpasangan. Seiring dengan elektron tersebut telah berpasangan, maka gelombang optimal berkisar antara 515-520 nm. Maka

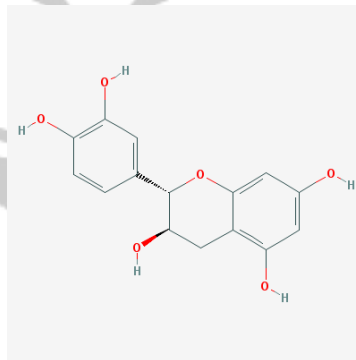


golongan polifenol. Menurut Soraya (2007), polifenol dapat menghancurkan radikal bebas yang merusak DNA dan¹⁴ menghentikan p
kanker. Selain hal tersebut, katekin memiliki fungsi lai



peroksinitrit dan superoksida, menghambat oksidasi lipid, menghambat oksidasi LDL (*low-density lipoprotein*), antimutagenik dan antikarsinogenik (Syah, 2006). Katekin (flavan-3-ol) banyak ditemukan di organ pada tanaman terutama buah. Keuntungan bagi tubuh dari katekin ini sudah banyak diteliti serta ditemukan tidak memiliki efek toksik bagi tubuh manusia (Chobot dkk., 2009).

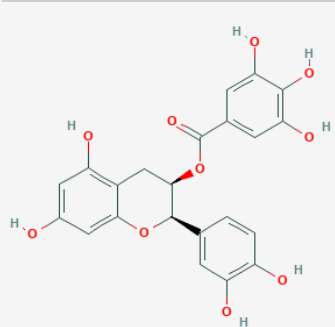
Katekin memiliki struktur kimia (Gambar 5) yang merupakan subkelas dari polifenol yang memiliki 4 turunan yakni epikatekin (EC), epikatekin galat (ECG), epigalokatekin (EGC), dan epigalokatekin galat (EGCG). Epigalokatekin galat merupakan antioksidan yang paling kuat dan merupakan 10-50 % pembawa kandungan dari total katekin pada daun teh. Epigalokatekin galat ini juga memiliki aktivitas antioksidan 100 kali lebih tinggi dibandingkan dengan vitamin C dan 25 kali vitamin E yang juga merupakan antioksidan potensial (Soraya, 2007).



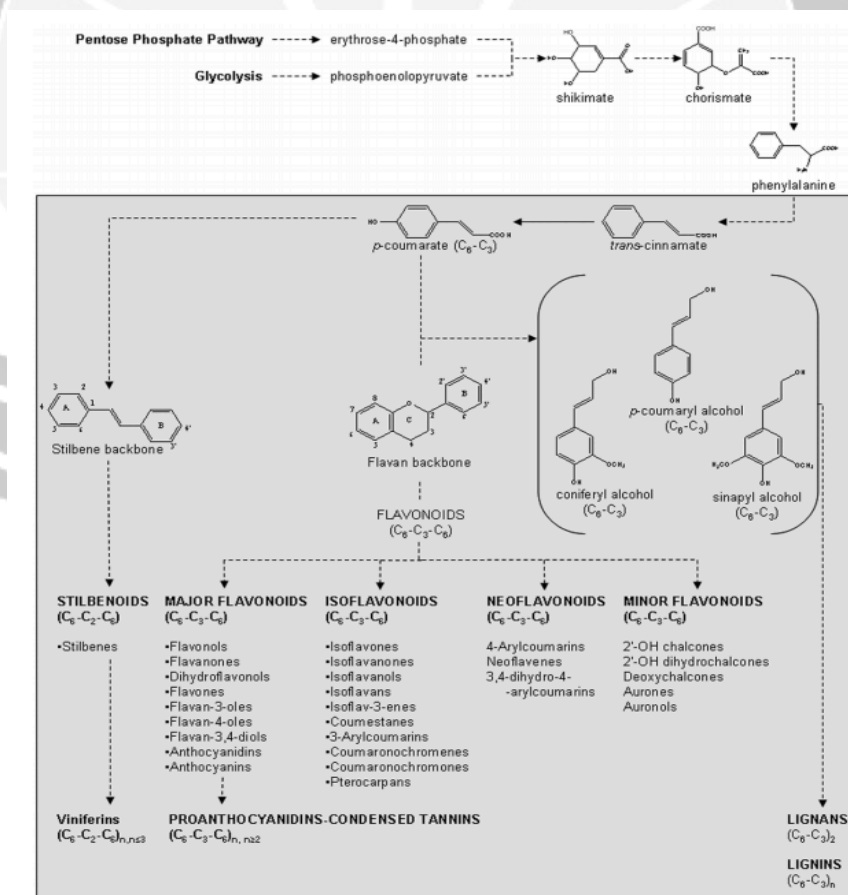
Gambar 5. Struktur kimia katekin (Pubchem NCBI, 2005)

Epikatekin galat (Gambar 6) merupakan salah satu turunan katekin yang merupakan senyawa metabolit sekunder, dan dibentuk oleh daun teh sebagai respon dari resistensi terhadap stres dan penyimpanan energi oleh daun teh itu sendiri (Wu dkk., 2014). Menurut Wu dkk. (2014), senyawa bioaktif katekin memiliki beberapa

efek terapeutik yang telah dilaporkan seperti mencegah kanker, kardiovaskuler, penghambat efek degeneratif neuron, serta beberapa penyakit lain yang disebabkan oleh stres oksidatif. Senyawa katekin dan turunannya dibentuk dalam proses biosintesis yang dapat dilihat pada (Gambar 7).



Gambar 6. Struktur kimia epikatekin galat (Pubchem NCBI, 2005)



Gambar 7. Diagram biosintesis katekin (Flavan 3-ol) dan turunannya (Verweridis dkk., 2007)

D. Kultur Kalus

Kultur jaringan (kultur *in vitro*) merupakan teknik memperbanyak tanaman dengan cara mengisolasi bagian tanaman seperti daun, mata tunas, serta menumbuhkan bagian-bagian tersebut dalam medium buatan secara aseptik yang kaya nutrisi dan zat pengatur tumbuh dalam wadah tertutup yang tembus cahaya sehingga bagian tanaman dapat memperbanyak diri dan bergenerasi menjadi tanaman lengkap. Prinsip utama dari teknik kultur jaringan adalah memperbanyak tanaman dengan menggunakan bagian vegetatif tanaman menggunakan media buatan yang dilakukan di tempat steril (Suryowinoto, 1991). Prinsip dasar kultur jaringan adalah totipotensi sel, yakni bagian tanaman hidup jika dibudidayakan di lingkungan yang sesuai, dapat tumbuh menjadi tanaman yang sempurna. Kultur jaringan biasanya digunakan untuk tanaman yang susah dikembang biakan secara generatif dan vegetatif *in vivo* (Henuhili, 2013).

Terdapat beberapa faktor yang akan memengaruhi keberhasilan teknik kultur jaringan menurut Zulkarnain (2009) adalah

a. Seleksi bahan eksplan

Semakin tua bahan eksplan yang akan ditanam, akan menyebabkan proses pembelahan sel akan cenderung menurun. Umumnya jaringan yang muda mudah untuk berproliferasi daripada jaringan berkayu dan jaringan tua. Semakin kecil ukuran eksplan, semakin kecil pula kemungkinan terjadinya kontaminasi, baik secara internal maupun eksternal serta memberikan peluang lebih rendah untuk menghasilkan variasi genetik akibat adanya kimera. Namun, eksplan

yang kecil lebih besar kemungkinannya untuk mengalami kerusakan selama penanganan kultur dan lebih peka terhadap kegagalan selama proses kultur.

b. Sterilisasi bahan eksplan

Apabila terjadi kontaminasi oleh cendawan dan bakteri, mikroorganisme ini akan sangat cepat tumbuh dalam waktu singkat dan akan menutupi permukaan medium, sehingga akan mengganggu pertumbuhan eksplan. Kontaminan juga dapat menyerang luka-luka akibat pemotongan yang akan menyebabkan kematian eksplan. Dengan kata lain, proses kultur harus bebas dari mikroorganisme dan organisme-organisme lainnya yang dapat menyebabkan kontaminasi.

c. Zat pengatur tumbuh

Fitohormon merupakan senyawa-senyawa yang dihasilkan oleh tanaman tingkat tinggi secara endogen. Senyawa ini berperan untuk merangsang dan meningkatkan pertumbuhan serta perkembangan sel, jaringan, dan organ tanaman. Beberapa zat pengatur tumbuh yang digunakan dalam kultur jaringan tumbuhan adalah auksin, sitokinin, giberelin, asam absisat, dan etilen.

Zat pengatur tumbuh akan sangat berpengaruh terhadap hasil dan tujuan yang akan dicapai dalam kultur. Dalam induksi kalus, untuk mendapatkan kalus dalam jumlah yang banyak menurut Hendaryono dan Wijayani (1994) komposisi dari fitohormon auksin dan sitokinin sangat dianjurkan dalam komposisi dan perbandingan tertentu. Penggunaan ZPT dalam induksi kalus juga dapat

menggunakan metode Mohr yakni dengan konsentrasi 2 dan 3 ppm masing-masing untuk hormon auksin dan sitokinin (atau sebaliknya).

Sitokinin yang dapat digunakan adalah kinetin dan BAP, sedangkan golongan auksin yang dapat digunakan adalah 2.4-D dan NAA. Zat pengatur tumbuh yang biasa digunakan dalam induksi kalus adalah 2.4-D, BAP, dicamba, serta NAA (Pardal, 2012). *Napthalene-acetic-acid* (NAA) merupakan golongan auksin sintesis yang sifatnya stabil karena tidak mudah terurai oleh enzim-enzim yang diproduksi sel tanaman ataupun karena panas (Hendaryono dan Wijayani, 1994). Selanjutnya, *Benzyl-amino-purine* (BAP) merupakan salah satu ZPT golongan sitokinin yang mempunyai sifat lebih stabil, murah serta dapat mendorong pembentukan kalus hingga merangsang munculnya tunas (Herawan dan Ismail, 2009).

Kultur *in vitro* pada tanaman akan menghasilkan kalus. Menurut George (2008), kalus dapat diinisiasi dari jaringan dan organ tanaman yang disebut eksplan. Eksplan yang dipilih sebaiknya merupakan jaringan yang muda dan masih tumbuh seperti bagian meristem pada daun muda, ujung batang, keping biji dan sebagainya (Zulkarnain, 2009; Hendaryono dan Wijayani, 1994). Kalus merupakan kumpulan sel *amorphous*, yang tidak terorganisasi dan belum berdiferensiasi (Heryanto, 2014).

Menurut Hendaryono dan Wijayani (1994), kalus akan tumbuh dari jaringan eksplan yang terluka. Sel yang luka menurut Gunawan (1992), akan menghasilkan senyawa-senyawa yang akan merangsang pembelahan sel pada lapisan berikutnya akibat sel luka yang melakukan otolisis. Menurut Narayanaswamy (1994), kalus

akan terbentuk dari hasil interaksi sejumlah faktor yang meliputi leptohormon (hormon luka), ZPT endogen dan eksogen, hadirnya nutrisi melimpah pada medium, serta kondisi inkubasi.

Kalus dapat terbentuk dari semua bagian dan organ tanaman, namun bedanya organ akan menunjukkan perbedaan pada kecepatan pembelahan sel sehingga waktu induksi kalus juga berbeda (Hartman dkk., 1990). Kalus yang ditumbuhkan selanjutnya dapat dimanipulasi untuk memproduksi metabolit sekunder karena kecepatan pertumbuhan selnya (Babu dkk., 2011).

Medium yang umum dan sering digunakan sebagai medium untuk kultur *in vitro* adalah medium Murashige dan Skoog (MS). Menurut Zulkarnain (2009) pH optimum medium ini adalah 5,6 – 5,8. Komposisi medium Murashige dan Skoog terdapat dalam Lampiran 1.

E. Kultur Suspensi Sel

Salah satu metode yang dapat digunakan untuk mempelajari perbanyakan tanaman serta produksi metabolit sekunder adalah kultur suspensi sel. Menurut Zulkarnain (2009), kultur suspensi sel merupakan teknik menumbuhkan sel atau agregat sel kalus ke dalam medium cair dengan tujuan untuk memperbanyak sel-sel yang kemudian dapat digunakan sebagai bahan memperbanyak tanaman terutama bagi tanaman yang pola regenerasinya melalui embrio somatik, sumber sel untuk protoplas, serta bahan memproduksi metabolit sekunder untuk industri. Keuntungan dari kultur suspensi sel adalah dihasilkannya sel atau kalus dalam

waktu singkat secara efisien. Kultur suspensi sel juga digunakan untuk memproduksi metabolit sekunder dari jenis tanaman yang dikulturkan.

Menurut Zulkarnain (2009), kultur suspensi sel akan baik apabila sumber sel merupakan kalus remah yang selanjutnya ditumbuhkan ke dalam medium cair. Pada saat inkubasi kultur juga perlu diberi aerasi. Pemberian aerasi dapat dilakukan dengan *shaker* yang harus dioperasikan secara terus-menerus dengan kecepatan penggojokan yang baik berkisar 90-100 rpm bergantung pada volume kultur. Dalam kultur suspensi sel, salah satu syarat yang menentukan keberhasilan suatu kultur menurut Wetter dan Constabel (1991) adalah medium. Medium akan menyediakan kebutuhan hara sel dan jaringan yang dikulturkan. Oleh karena itu, suatu medium kultur suspensi sel harus mengandung hara dan komponen penyusun yang serupa pada induksi kalus sebelumnya. Hal ini bertujuan untuk mencegah adaptasi ulang dari kalus yang akan disuspensi (Wetter dan Constabel, 1991).

F. Elisitasi

Guna menghasilkan produk metabolit sekunder yang optimal menurut Mattel dan Smith (1993), perlu adanya optimasi faktor-faktor internal dan eksternal. Optimasi tersebut dapat dilakukan dalam dua tahap yakni pada tahap pertumbuhan dan tahap produksi. Salah satu cara peningkatan metabolit sekunder pada tahap produksi adalah dengan elisitasi.

Menurut Junaira dkk. (2014), elisitasi merupakan salah satu metode dalam kultur jaringan guna meningkatkan metabolit sekunder dengan menambahkan agen elisitor. Fungsi dari elisitor yang ditambahkan adalah untuk menginduksi dan

meningkatkan produksi metabolit sekunder. Menurut Purwianingsih dan Hamdiyati (2013), elisitasi merupakan metode induksi secara stimulan pembentukan metabolit sekunder contohnya senyawa fitoaleksin yang berfungsi sebagai anti mikrobial. Elisitasi dapat dilakukan dengan menggunakan elisitor biotik maupun abiotik.

Elisitor menurut Junaira dkk. (2014) dan Caldentey dan Bars (2002) merupakan molekul signal berupa komponen aktif yang memacu terbentuknya metabolit sekunder dalam kultur sel dengan menginduksi respon perlindungan diri (*defense*) ketika diaplikasikan pada jaringan tanaman. Elisitor yang terbentuk dari bahan hayati disebut elisitor biotik, sedangkan elisitor dari bahan kimiawi maupun fisik dinamakan elisitor abiotik. Elisitor biotik dapat berupa polisakarida, protein, glikoprotein atau fragmen-fragmen dinding sel yang berasal dari fungi, bakteri, dan tanaman. Elisitor biotik yang sering digunakan adalah fungi atau ragi. Fungi seringkali dipelajari secara luas untuk metabolis sekunder juga.

Menurut Caldentey dan Bars (2002) elisitor abiotik merupakan elisitor yang dikarenakan dampak dari fisika dan stres kimia seperti iritasi ultraviolet (UV), kejutan panas dan dingin, serta logam berat. Elisitor abiotik akan menginduksi elisitor biotik pada dinding sel, sehingga hal tersebut membuktikan bahwa elisitor tidak hanya menginduksi formasi dari fitoaleksin tetapi juga mengaktifkan potensial biosintesis dari beberapa metabolit-metabolit yang selalu diproduksi pada kultur sel tanaman.

Beberapa faktor yang memengaruhi kandungan metabolit sekunder dalam kultur yang dielisitasi menurut Pandiangan (2011) adalah macam elisitor yang digunakan, konsentrasi elisitor, waktu kontak elisitor dengan sel tumbuhan, galur

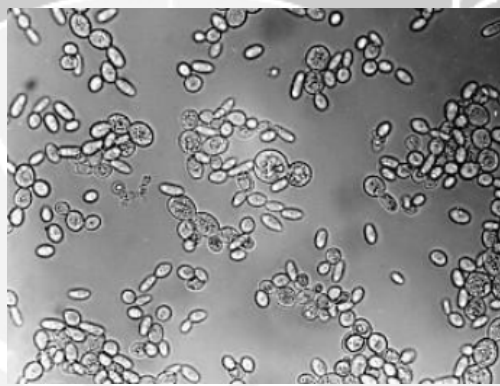
sel yang digunakan, waktu penambahan elisitor dan fase pertumbuhan sel dalam kultur, serta nutrisi yang digunakan dalam medium. Berdasarkan faktor macam elisitor yang digunakan, elisitor biotik yang dapat digunakan sebagai elisitor yang baik dapat berupa homogenat kultur kompleks yang berasal dari jamur, bakteri, khamir serta fraksi-fraksinya (Sitinjak dkk., 2000). Faktor lainnya yang dapat memengaruhi produksi metabolit sekunder menurut Mariska (2013), adalah formulasi atau komposisi media kultur; faktor fisik seperti suhu, cahaya, kelembaban; faktor genetik (genotip sel); serta faktor stress lingkungan (logam berat, hadirnya elisitor, sinar UV, dll).

G. Elisitor *Saccharomyces cerevisiae*

S. cerevisiae merupakan mikroorganisme yang sudah sangat dikenal masyarakat karena banyak dimanfaatkan sebagai ragi roti dan bahan makanan serta minuman yang difermentasi. Selain itu, juga banyak digunakan dalam industri etanol (Umbreit, 1959). Menurut Prescott dan Dunn (1959), *S. cerevisiae* merupakan mikroorganisme sel tunggal dengan ukuran 5 - 20 mikron, berbentuk bola atau telur serta tidak bersifat motil karena tidak memiliki struktur tambahan seperti flagella. Dalam tatanan taksonomi menurut Sanger (2004), *S. cerevisiae* digolongkan menjadi:

Kerajaan	: <i>Fungi</i>
Divisi	: <i>Ascomycota</i>
Subdivisi	: <i>Saccharomycotina</i>
Kelas	: <i>Ascomycetes</i>
Bangsa	: <i>Saccharomycetales</i>
Suku	: <i>Saccharomycetaceae</i>
Marga	: <i>Saccharomyces</i>
Jenis	: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>

S. cerevisiae (Gambar 8) dapat tumbuh dalam media cair dan padat dengan sistem reproduksi secara aseksual dengan pembentukan tunas. Proses pembentukan tunas dimulai dengan timbul suatu gelembung kecil calon tunas dari induk yang kemudian membesar dan apabila sudah berukuran sebesar. Induk kemudian akan melakukan pengerutan yang selanjutnya terjadi pelepasan tunas dari induk.



Gambar 8. Bentuk sel *S. cerevisiae* (Rochani dkk., 2016)

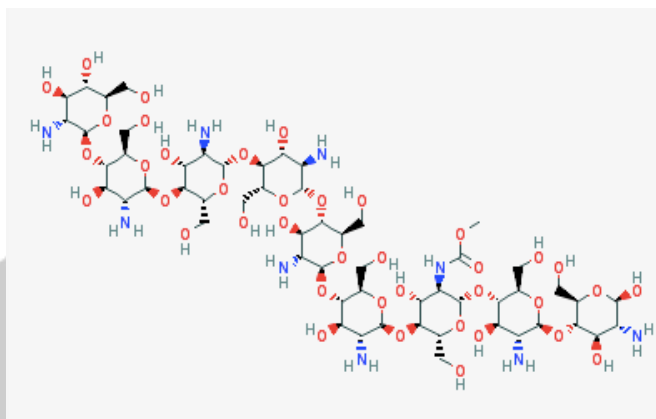
Penggunaan jamur baik kapang maupun khamir sebagai media elisitor untuk meningkatkan kadar metabolit sekunder sudah banyak diteliti. Salah satunya menggunakan *S. cerevisiae*. Penggunaan khamir (*S. cerevisiae*) sebagai bahan elisitor mempunyai keuntungan antara lain mudah diperoleh, siklus hidup relatif pendek, tidak patogen bagi manusia dan dapat tumbuh pada pH rendah (Sitinjak dkk., 2000). *S. cerevisiae* yang digunakan sebagai agen elisitor untuk meningkatkan senyawa fenol ataupun polifenol akan menyebabkan induksi dari asam jasmonat ataupun metil jasmonat endogen yang akan berdampak pada produksi metabolit sekunder (Abraham dkk., 2011). Selain hal tersebut, menurut Sitinjak (2000), *S. cerevisiae* yang diinkubasikan pada kalus menyebabkan kalus mengalami cekaman yang terlihat pada perubahan warna kalus menjadi

kecoklatan. Perubahan warna kalus ini terjadi karena akumulasi fitoaleksin serta sintesis senyawa fenolik.

H. Elisitor Kitosan

Kitosan merupakan polimer dari 2-amino-2-deoksi-D-glukosa yang merupakan hasil deasetilasi kitin yakni kitin yang telah mengalami penghilangan gugus asetil (Mahatmanti dan Sumarni, 2003; Suhardi, 1992). Kitosan ditemukan pertama kali oleh Rouget pada tahun 1859 dengan cara mendidihkan kitin dalam larutan KOH yang sangat pekat dan larut dalam asam organik. Kitosan akan memberikan warna violet bila direaksikan dengan iodin dan asam, sedangkan kitin akan menghasilkan warna coklat.

Menurut Kawamura dkk. (1993), untuk membedakan polimer kitin dan kitosan adalah berdasarkan kandungan nitrogennya. Polimer kitin mempunyai kandungan nitrogen kurang dari 7 % dan kitosan mempunyai kandungan nitrogen lebih dari 7 %. Berat molekul kitosan adalah sebesar $1,2 \times 10^5$ yang tergantung pada degradasi yang terjadi selama proses deasetilasi. Sifat-sifat kitosan dihubungkan dengan adanya gugus-gugus amino ($-NH_2$) dan hidroksil ($-OH$) yang terikat. Adanya gugus tersebut akan menyebabkan meningkatnya reaktifitas kitosan dan memberikan sifat polielektrolit kation yang akan berperan sebagai amino pengganti. Struktur kitosan dapat dilihat pada Gambar 9.



Gambar 9. Struktur kimia kitosan (Pubchem NCBI, 2005)

Penggunaan kitosan sebagai elisitor terkait dengan peran kitosan yang akan menginduksi enzim *Phenylalanine Ammonia Lyase* (PAL) yang merupakan enzim kunci dari jalur biosintesis senyawa fenol. Katalisasi pembentukan polifenol, terutama epigalokatekin galat, terjadi karena enzim PAL ini banyak menunjukkan korelasi positif antara aktivitasnya dengan akumulasi dari senyawa fenol. Selain hal tersebut, kitosan banyak diperhatikan dalam bidang agrikultur sebagai stimulator sistem pertahanan pada tumbuhan yang juga banyak digunakan secara luas sebagai elisitor untuk hasil metabolit sekunder pada tumbuhan (Srisornkompon dkk., 2014).

Selain aktivitas enzim PAL yang meningkat, menurut Khan dkk. (2003), kitosan juga meningkatkan aktivitas *Tyrosine Ammonia Lyase* (TAL). Produk dari TAL dan PAL yang dimodifikasi akan meningkatkan metabolisme *phenylpropanoid* yang merupakan prekursor dari metabolit sekunder, lignin, pigmen flavonoid, dan fitoaleksin. Semua senyawa tersebut memiliki peran penting dari interaksi patogen-tumbuhan. Interaksi tersebut menyebabkan respon dari tumbuhan yang ditandai dengan meningkatnya metabolit sekunder.

I. Pengaruh Elisitor Ekstrak *Saccharomyces cerevisiae* dan Kitosan Terhadap Enzim *Phenylalanine Ammonia Lyase* (PAL)

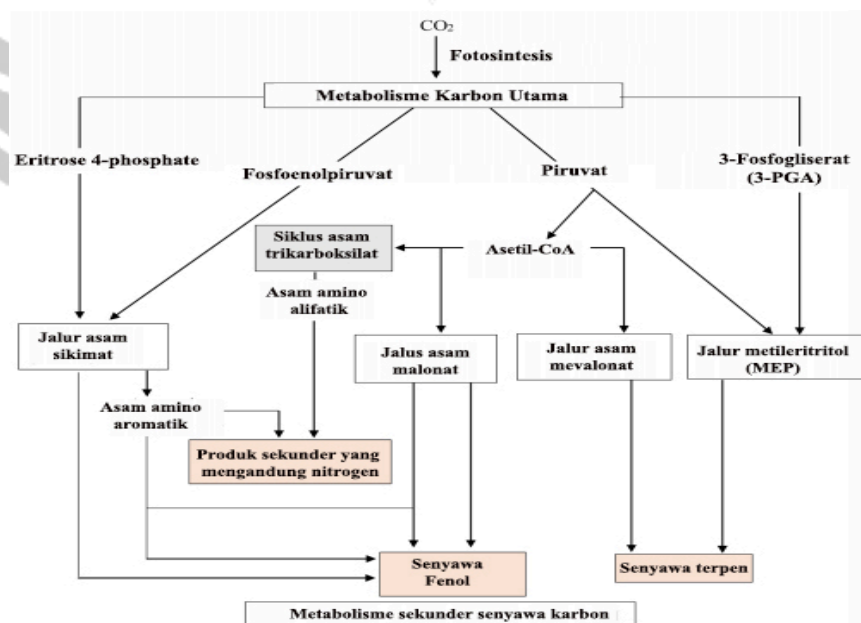
Menurut Kurniawan (2013), suatu tanaman akan memberikan efek yang berbeda terhadap serangan patogen (bubuk *S. cerevisiae* dan kitosan). Tanaman akan menunjukkan gejala apabila terjadi kecocokan antara patogen dan tanaman inang, melalui proses pengenalan patogen. Proses pengenalan patogen dilakukan oleh tanaman inang terhadap patogen melalui suatu isyarat pengenal patogen yang dapat berupa asam lemak pada kutikula pengimbas kutinase patogen, molekul galakturonat pada pektin pengimbas enzim pektinase patogen, strigol yang merupakan senyawa fenol pemacu aktivasi dan perkecambahan propagul patogen, fenol dan gula yang keluar dari luka akan mengaktifkan sejumlah gen patogen tertentu dan lektin.

Bakteri cukup menempel pada permukaan sel tanaman untuk dapat mengaktifkan sistem ketahanan dari tanaman tersebut. Oleh karena sudah terjadi penetrasi, tanaman akan mengenali patogen tersebut dan selanjutnya menginduksi ketahanan fisik berupa struktural maupun biokimia (Kurniawan, 2013). Menurut Kurniawan (2013), ketahanan struktural dapat berupa pembentukan suberin, tilosis, pembentukan lapisan absisat, dan deposisi gum, sedangkan ketahanan biokimia dapat berupa pembentukan senyawa racun, pembentukan senyawa fenol, pembentukan fitoaleksin, sintesis protein baru, inaktivasi enzim dan racun, dan perubahan jalur biosintesis.

Enzim *Phenylalanine Ammonia Lyase* (PAL) merupakan salah satu enzim hasil respon terhadap infeksi awal oleh patogen. Enzim ini merupakan enzim kunci dalam pembentukan fenol yang akan membantu proses deaminasi fenilalanin

(Wijaya dkk., 2009). Menurut Kurniawan (2013), infeksi patogen akan membuat tanaman mengalami stres fisiologi yang selanjutnya akan menstimulasi tanaman untuk mensintesis protein (enzim) baru sebagai usaha pertahanan tanaman. Contoh sintesis enzim sebagai respon dari patogen adalah peningkatan sintesis dan aktivitas *Phenylalanine Ammonia Lyase* (PAL) yang akan membantu proses sintesis fenol, fitoaleksin, dan lignin sebagai mekanisme pertahanan diri. Semakin cepat pembentukan produk dan banyaknya produk yang dihasilkan akan meningkatkan keefektifitasan sistem pertahanan.

Sintesis enzim sebagai respon dari patogen menurut Kurniawan (2013), akan menyebabkan respirasi pada tanaman yang sakit. Aktivitas glikolisis yang merupakan salah satu tahap dari respirasi sebagian prosesnya akan diubah menjadi jalur pentosa yang juga merupakan respon pertahanan tanaman. Beberapa senyawa hasil glikolisis dan jalur pentosa dimanfaatkan pada jalur shikimat (Gambar 10) yang menghasilkan senyawa fenol, terpen, dan terjadinya lignifikasi.



Gambar 10. Jalur reaksi pembentukan senyawa metabolit sekunder (Ncube dan Staden, 2015)

Proses biosintesis senyawa fenolik yang diinisiasi oleh jalur biosintesis asam sikimat menurut Dicko dkk. (2006), selanjutnya akan memproduksi fenilalanin. Fenilalanin ini akan diaminasi oleh enzim *Phenylalanine Ammonia Lyase* (PAL) menjadi derivat asam sinamat. Derivat tersebut selanjutnya akan diubah menjadi senyawa fenol secara berkesinambungan oleh enzim *cinnamate-4-hydroxylase*, *4-coumarate CoA ligase*, *acetyl CoA carboxylase*, *chalcone synthase*, dan *chalcone flavone isomerase*. Aktivitas PAL tidak secara langsung berasosiasi dengan proses pembentukan polimer fenol, namun PAL secara tidak langsung terlibat dalam sintesis hampir seluruh senyawa fenol.

J. Kromatografi Lapis Tipis

Menurut Stahl (1985), kromatografi lapis tipis (KLT) merupakan metode pemisahan fisikokimia menggunakan plat yang dilapisi silika gel ataupun materi lainnya. Pemisahan sampel dilakukan oleh fase gerak atau eluen yang bergerak sepanjang plat, dengan kecepatan pergerakan senyawa tergantung pada fase diam dan fase geraknya. Visualisasi kemudian dapat dilakukan dengan pemberian pewarna atau menggunakan penyinaran UV. Pergerakan substansi memberikan nilai R_f yang dapat digunakan untuk perbandingan dengan substransi referensi. Pergerakan senyawa tersebut akan bergantung pada polaritas senyawa (Koolman dan Roehm, 2005).

Fase gerak menurut Stahl (1985) merupakan medium angkut yang terdiri dari satu atau beberapa pelarut dengan tingkat mutu analitik yang baik. Sistem pelarut merupakan multikomponen yang berupa campuran sederhana yang terdiri atas

maksimum tiga komponen. Fase diam merupakan fase polar dan non-polar yang biasa ditempatkan di plat kaca, plastik, atau aluminium. Beberapa fase diam yang biasa digunakan adalah silika gel, alumina, kieselguhr, magnesium silikat, selulosa, dan resin (Sumarno, 2011).

Penggunaan kromatografi lapis tipis ini dilakukan dengan penotolan dengan menggunakan pipa kapiler atau menggunakan mikropipet dengan volume totalan berkisar antara 1 – 20 μL (Holme dan Peck, 1998). Penotolan harus dilakukan dengan teliti agar permukaan plat tidak rusak dan larutan standar harus ditotolkan juga pada plat yang sama sebagai pembanding atau referensi. Setelah ditotolkan, plat kemudian dimasukkan ke dalam *chamber* jenuh yang berisikan fase gerak dengan kedalaman 0,5 – 1 cm. Jalannya eluen dihentikan apabila telah mencapai batas akhir (± 1 cm dari batas atas).

Senyawa yang dipisahkan dalam KLT dapat diidentifikasi menggunakan perbandingan nilai RF senyawa standar dengan ekstrak. Menurut Pramesthi (2008) *Retention factor* (RF) merupakan perbandingan rambatan senyawa dengan rambatan pelarut. Menurut Stahl (1985), angka Rf dapat dihitung dengan menggunakan rumus:

$$R_f = \frac{\text{jarak garis depan dari titik awal}}{\text{jarak titik pusat bercak dari titik awal}}$$

angka Rf ini berjangka diantara 0,00 hingga 1,00 dan dapat dinyatakan dalam hRf yang dikalikan dengan faktor 100 (h) akan menghasilkan nilai berjangka 0 – 100.

Menurut Heinrich dkk. (2004), lempeng atau fase diam biasanya dilapisi dengan *adsorbent* dengan indikator *fluorescens* (F_{254}), sehingga akan mengabsorpsi sinar UV pada panjang gelombang 254 nm yang memberikan warna hijau pada plat.

Senyawa akan ditunjukkan dengan spot hitam pada latar belakang plat yang berwarna hijau. Beberapa senyawa alam akan tidak tampak dengan deteksi UV, sehingga memerlukan reagen pewarna yang disemprotkan seperti vanilin-asam sulfat, reagen Gragendorff, asam fosfomolibdat, antimoni triklorida, dan anisaldehyd-asam sulfat.

Kromatografi lapis tipis biasanya digunakan untuk pengujian kualitatif yang kemudian dibandingkan dengan senyawa pembanding atau standar. Namun, KLT dapat digunakan juga untuk pengujian kuantitatif dengan pengujian KLT densitometri (Sastrohamidjojo, 1985). Penetapan kadar senyawa dengan metode ini dilakukan dengan mengukur densitas bercak senyawa yang terpisah pada KLT. Penentuan kadar senyawa uji dengan menggunakan alat densitometer dapat dilakukan dengan dua cara, yakni dengan perbandingan daerah *Area Under the Curve* (AUC) sampel dengan standar atau dengan membuat kurva standar hubungan konsentrasi senyawa standar dengan daerah AUC.

Menurut Supardjan (1987), kurva standar didapatkan dengan menghubungkan konsentrasi dengan nilai absorbansi suatu sampel atau AUC yang diperoleh dengan menotolkan variasi (deret) konsentrasi larutan standar. Bercak yang diperoleh dicari nilai AUC-nya dan dari kurva standar yang terbentuk, akan diperoleh persamaan garis $y = bx + a$. Huruf x merupakan kadar zat yang ditotolkan sedangkan y adalah AUC.

K. Hipotesis

Berdasarkan kajian pustaka, maka dapat diajukan beberapa hipotesis sebagai berikut:

1. Morfologi kalus induksi eksplan daun teh *C. sinensis* L. memiliki tekstur remah berwarna hijau.
2. Waktu optimal untuk memanen *S. cerevisiae* yang akan digunakan sebagai elisitor adalah 18 jam.
3. Kombinasi elisitor bubuk *S. cerevisiae* dan kitosan dapat meningkatkan total fenolik, aktivitas antioksidan, dan kadar epikatekin galat pada kultur suspensi daun teh.