

I. TINJAUAN PUSTAKA

A. *Chrysanthemum morifolium* Ramat

Krisan merupakan tanaman bunga hias berupa perdu dengan sebutan lain Seruni atau Bunga emas (*Golden Flower*) berasal dari dataran Cina. Krisan kuning berasal dari dataran Cina, dikenal dengan *Chrysanthemum indicum* (kuning), *C. morifolium* (ungu dan pink) dan *C. daisy* (bulat, ponpon). Pada abad ke-4 tanaman krisan mulai dibudidayakan di Jepang dan tahun 797 bunga krisan dijadikan sebagai simbol kekaisaran Jepang dengan sebutan *Queen of The East*. Tanaman krisan dari Cina dan Jepang menyebar ke kawasan Eropa dan Perancis tahun 1795. Tahun 1808 Mr. Colvil dari Chelsea mengembangkan delapan varietas krisan di Inggris. Jenis atau varietas krisan modern diduga mulai ditemukan pada abad ke-17. Krisan masuk ke Indonesia pada tahun 1800. Sejak tahun 1940, krisan dikembangkan secara komersial (Rukmana dan Mulyana, 1997).

Tanaman krisan merupakan tanaman semusim (anual) yang pembungaannya berkisar 9-12 hari tergantung varietas dan lingkungan tempat menanamnya. Tanaman krisan dapat dipertahankan hingga beberapa tahun bila dikehendaki, tetapi bunga yang dihasilkan biasanya jauh menurun kualitasnya (Hasyim dan Reza, 1995). Menurut Rukmana dan Mulyana (1997), tanaman krisan tumbuh menyemak setinggi 30-200 cm, sistem perakarannya serabut yang keluar dari batang utama. Akar menyebar ke segala arah pada radius dan kedalaman 50-70 cm atau lebih. Batang tanaman

krisan tumbuh agak tegak dengan percabangan yang agak jarang, berstruktur lunak, dan berwarna hijau tetapi bila dibiarkan tumbuh terus, batang berubah menjadi keras (berkayu) dan berwarna hijau kecoklatan, serta berdiameter batang sekitar 0,5 cm. Bunga krisan merupakan bunga majemuk, di dalam satu bonggol bunga terdapat bunga cakram yang berbentuk tabung dan bunga tepi yang berbentuk pita (Gambar 1). Bunga tabung dapat berkembang dengan warna yang sama atau berbeda dengan bunga pita. Pada bunga pita terdapat bunga betina (pistil), sedangkan bunga tabung terdiri atas bunga jantan dan bunga betina (biseksual) dan biasanya fertil. Dengan bentuk dan warna bunga krisan yang beranekaragam memungkinkan banyak pilihan bagi konsumen (Sanjaya, 1996)

Menurut Rukmana dan Mulyana (1997), tingkatan takson dari krisan adalah sebagai berikut:

Kerajaan : Plantae
 Divisi : Spermatophyta
 Sub Divisi : Angiospermae
 Kelas : Dicotyledonae
 Bangsa : Asterales
 Suku : Asteraceae
 Marga : *Chrysanthemum*
 Spesies : *Chrysanthemum morifolium* Ramat
 Cultivar : Puspita Pelangi



Gambar 1. *Chrysanthemum morifolium* Ramat cv. Puspita Pelangi
 (Sumber : Balai Tanaman Hias Cipanas, 2012)

Bunga krisan adalah bunga majemuk yang terdiri atas banyak bunga yang disebut *floret* (Gambar 2). Setiap *floret* pada bagian dalam mempunyai lima buah petal yang bersatu pada pangkalnya dan membentuk korola. *Floret* yang terdapat pada bagian luar disebut *ray floret*. *Floret* yang terdapat pada bagian dalam disebut *disk floret*. Setiap *floret* terdapat kepala putik yang terdiri atas ovari, bakal biji dan stilus yang menghubungkan ovari dengan stigma. *Ray floret* pada umumnya hanya mengandung pistil dan tidak mempunyai stamen dan polen, sedangkan *disk floret* mengandung dua alat reproduktif sehingga mempunyai banyak kemungkinan untuk menghasilkan biji (Cumming, 1964).



Gambar 2. Morfologi Bunga Krisan
(Sumber : Cumming, 1964)

Penelitian mengenai kultur *in vitro* pada *Chrysanthemum* pertama kali dilakukan oleh Morel dan Martin pada tahun 1952. Mereka menggunakan kultur jaringan meristem untuk mendapatkan tanaman yang bebas virus.

Banyak penelitian yang sukses melakukan caulogenesis dan organogenesis dari *Chrysanthemum*. Banyak pihak yang telah mendapatkan tunas organogenesis dari floret yang berasal dari kalus (Bush dkk., 1976).

Bunga dari krisan sudah lama digunakan sebagai obat tradisional Cina (Ye dkk., 2007). Penelitian telah menunjukkan bahwa krisan memiliki fungsi untuk menghilangkan kelemahan otot pada jantung dan mengurangi efek ritme yang terlalu keras pada detak jantung (Zhang dkk., 2009). Kemampuan krisan sebagai tanaman herbal berhubungan dengan komponen bioaktif yang terkandung di dalamnya. Namun informasi dan penelitian tentang kandungan senyawa kimia dalam krisan masih sangat sedikit (Sun dkk., 2010). Terdapat berbagai laporan yang mengatakan komponen-komponennya seperti asam klorogenat, flavonoid dan pentasiklik triterpena memiliki fungsi / aplikasi klinik, sebagai anti-HIV, anti-tumor dan anti aktivitas mutagenik (Chen dkk., 2005).

Bunga dari krisan sudah lama digunakan untuk mengobati berbagai penyakit seperti demam, sakit kepala, batuk dan gangguan penglihatan secara tradisional. Beberapa kandungan senyawa alami yang potensial seperti flavonoid, triterpenoid dan *caffeoylquinic acid derivatives* telah diisolasi pada beberapa penelitian sebelumnya. Senyawa-senyawa menunjukkan efek farmakologi yang sangat luas, diantaranya sebagai penghambat dari aktivitas enzim HIV-1 *integrase* dan *aldose reductase*, dan sebagai antioksidan, anti-radang, anti-mutagenik dan anti-aktivitas alergi (Xie dkk., 2009).

Pada penelitian oleh Sun dkk. (2010), dilakukan identifikasi senyawa flavonoid dan senyawa volatil dari bunga *C. morifolium* Ramat dengan menggunakan HPLC dan GC/MS. Pada penelitian ini terdapat delapan senyawa flavonoid dan 58 senyawa volatil yang teridentifikasi. Diantaranya 4 senyawa flavonoid glukosida, yaitu vitexin-2-O-rhamnosida, quercetin-3-galaktosida, luteolin-7-glukosida dan quercetin-3-glukosida (Tabel 1).

Tabel 1. Kandungan Flavonoid pada Ekstrak Bunga Krisan (*C. Morifolium* Ramat)

Senyawa Flavonoid	Kadar (mg/gr)
Vitexin-2-O- rhamnoside	0.10 ± 0.01
Quercetin-3-galactoside	2.46 ± 0.02
Luteolin-7-glucoside	50.59 ± 0.94
Quercetin-3- glucoside	1.33 ± 0.09
Quercitrin	21.38 ± 0.80
Myricetin	2.13 ± 0.08
Luteolin	5.22 ± 0.48
Apigenin	0.70 ± 0.10
Kaempferol	0.14 ± 0.02
Total	83.95 ± 2.77

Sumber : Sun dkk. (2010)

B. Kultur *in vitro* dan Induksi Kalus

Kultur jaringan didefinisikan sebagai suatu teknik menumbuhkembangkan bagian tanaman, baik berupa sel, jaringan, atau organ dalam kondisi aseptik secara *in vitro*, yang dicirikan oleh kondisi kultur yang aseptik, penggunaan media kultur buatan dengan kandungan nutrisi lengkap dan Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) serta kondisi ruang kultur yang suhu dan

pencayaannya terkontrol (Yusnita, 2004). Perbanyakan secara kultur jaringan akan menawarkan peluang besar untuk menghasilkan jumlah bibit yang banyak dalam waktu relatif singkat. Selain itu kultur jaringan juga dapat mempertahankan sifat induk yang unggul dan dapat menghasilkan bibit yang bebas cendawan, bakteri, virus dan hama penyakit (Prihandana dan Hendroko, 2006).

Metode kultur *in vitro* dikembangkan untuk membantu memperbanyak tanaman, khususnya untuk tanaman yang sulit dikembangkan secara generatif. Bibit yang dihasilkan dari kultur jaringan mempunyai keunggulan, antara lain mampu menghasilkan bibit dalam jumlah besar dengan waktu singkat dan tidak membutuhkan tempat yang luas, kesehatan dan mutu bibit lebih terjamin, kecepatan tumbuh bibit lebih cepat dibandingkan dengan perbanyakan secara konvensional, mempunyai sifat identik dengan induknya (Fatmawati, 2008).

Kultur *in vitro* termasuk teknik perbanyakan tanaman secara vegetatif buatan berdasar sifat totipotensi tumbuhan. Totipotensi adalah kemampuan sel tanaman untuk tumbuh menjadi organ baru meskipun sudah tua. Teknik kultur *in vitro* dapat berhasil dengan baik apabila syarat-syarat yang diperlukan terpenuhi, meliputi pemilihan eksplan sebagai bahan dasar untuk pembentukan kalus, penggunaan medium yang cocok, keadaan yang aseptik dan pengaturan udara yang baik terutama untuk kultur cair. Meskipun pada prinsipnya semua jenis sel dapat ditumbuhkan, tetapi sebaiknya dipilih bagian tanaman yang masih muda dan mudah tumbuh yaitu bagian meristem,

misalnya daun muda, ujung batang, keping biji, dan sebagainya (Hendaryono dan Wijayani, 1994).

Dalam bidang farmasi, kultur jaringan tanaman mempunyai manfaat yang besar yaitu selain menghasilkan tanaman sumber simplisia yang seragam juga mampu menghasilkan metabolit sekunder sebagai bahan obat. Tanaman tersebut menghasilkan metabolit sekunder dengan struktur molekul dan aktivitas biologi yang beraneka ragam sehingga memiliki potensi yang sangat baik untuk dikembangkan menjadi obat berbagai penyakit (Hendaryono dan Wijayani, 1994).

Kalus adalah proliferasi massa jaringan yang belum terdiferensiasi. Massa sel ini terbentuk di seluruh permukaan irisan eksplan, sehingga semakin luas permukaan irisan eksplan semakin cepat dan 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, 1992).

Menurut George dan Sherrington (1984), biomassa yang dihasilkan dari kultur kalus dan suspensi sel dalam kultur *in vitro* dapat berbeda dalam tekstur, warna, dan kuantitas. Hal ini dapat terjadi karena eksplan yang digunakan berasal dari tumbuhan atau bagian yang berbeda, diperoleh pada waktu yang berbeda, serta jenis dan konsentrasi ZPT yang digunakan.

Keseimbangan ZPT dalam medium sangat mempengaruhi pertumbuhan kalus maupun diferensiasinya membentuk tunas. Morfogenesis

eksplan tergantung kepada keseimbangan auksin dan sitokinin di dalam medium dan interaksi antara ZPT endogen di dalam tanaman dan ZPT eksogen yang diserap dari medium tumbuh (Wattimena dkk., 1992). Terbentuknya kalus disebabkan adanya penambahan ZPT eksogen (Sudirga, 2002). Kondisi warna kalus yang bervariasi menurut Hendaryono dan Wijayani (1994) bisa disebabkan oleh adanya pigmentasi, pengaruh cahaya dan bagian tanaman yang dijadikan sebagai sumber eksplan. Tanda bahwa kalus yang diregenerasikan dapat membentuk tunas antara lain terjadinya perubahan warna dari kecoklatan atau dari kuning menjadi putih kekuningan selanjutnya menjadi kehijauan, perubahan warna tersebut merupakan tanda adanya morfogenesis (Lestari dan Mariska, 2003).

Kalus yang remah dapat diperoleh dengan cara melakukan sub kultur berulang-ulang dengan medium padat. Pembentukan kalus dipengaruhi oleh zat-zat tertentu dalam medium seperti zat pengatur tumbuh. Konsentrasi 2,4-D dan ekstrak khamir yang tinggi akan menghasilkan kalus bertekstur remah (*friable*) (Rahayu dkk., 2003).

C. Metabolit Sekunder

Menurut Mann (1989), tumbuhan sangat penting tidak hanya sebagai bahan sandang, pangan, papan tetapi juga sebagai penghasil bermacam-macam senyawa kimia. Setiap tanaman akan memproduksi bermacam-macam senyawa kimia untuk tujuan tertentu. Senyawa kimia ini lebih banyak

fungsiya untuk bersaing dengan makhluk hidup lainnya. Senyawa ini disebut dengan metabolit sekunder (Tadeo, 2008).

Sebagian besar dari senyawa kimia yang diambil dari tumbuhan berupa metabolit sekunder (Mann, 1989). Menurut Raharjo dkk. (2000), senyawa aktif yang terdapat di dalam suatu tumbuhan disebut sebagai metabolit sekunder. Metabolit sekunder tersebut sangat menentukan khasiat tumbuhan obat yang banyak dipengaruhi oleh habitat, lokasi tumbuh, perlakuan pra dan pasca panen. Produksi senyawa metabolit sekunder tergantung pada tahap-tahap perkembangan organisme (diferensiasi sel) yang menghasilkannya. Pada kultur *in vitro* produksi senyawa metabolit sekunder seringkali berasosiasi dengan diferensiasi sel atau jaringan yang dikulturkan (Wattimena dkk., 1992).

Lindsey dan Jones (1989) menyatakan bahwa manfaat metabolit sekunder adalah sebagai bahan-bahan kimia alami yang bernilai komersial dan berperan sebagai proteksi, digunakan tumbuhan untuk melawan penyakit, serangan serangga atau binatang pemangsanya (predator).

Salah satu metoda yang sering digunakan untuk memproduksi metabolit sekunder tumbuhan adalah kultur *in vitro*. Menurut Hendaryono dan Wijayani (1994), kultur *in vitro* mempunyai manfaat besar di bidang farmasi karena dari usaha ini dapat menghasilkan metabolit sekunder sebagai pembuatan obat-obatan. Pada umumnya untuk mempelajari sintesis metabolit sekunder secara *in vitro* yang sering digunakan adalah kultur organ, kultur suspensi sel dan kultur kalus (Manthell dan Smith, 1983). Fowler (1983) juga

menyatakan bahwa kultur kalus dan kultur sel tumbuhan secara *in vitro* adalah sumber yang potensial untuk produksi metabolit sekunder.

Lebih dari 30 metabolit sekunder dapat dihasilkan melalui kultur sel dengan tingkat konsentrasi yang jauh melebihi dari tumbuhan induknya (Balandrin dkk., 1985). Menurut Wattimena (1991), enzim memegang peranan penting dalam setiap proses metabolisme maka setiap proses yang dapat mengatur sintesis, aktivasi, perombakan dan inaktivasi dari enzim mempunyai pengaruh yang nyata terhadap proses fisiologi dan biokimia tanaman.

Kadar metabolit sekunder dapat ditingkatkan antara lain dengan penambahan ZPT. Pengaruh pemberian ZPT terhadap kadar metabolit sekunder dapat memberikan hasil yang bervariasi, tergantung oleh spesies tumbuhan yang dibudidayakan, jenis dan konsentrasi ZPT yang ditambahkan. Aplikasi ZPT mempunyai peluang yang cukup besar karena dapat memanipulasi metabolit sekunder seperti senyawa alkaloid, flavonoid, saponin dan tanin yang dikandungnya (Moko dkk., 1993). ZPT berperan dalam pengikatan membran protein yang berpotensi untuk aktivitas enzim. Hasil pengikatan ini mengaktifkan enzim tersebut dan mengubah substrat menjadi beberapa produk baru. Produk baru yang terbentuk ini menyebabkan serentetan reaksi-reaksi sekunder salah satunya adalah pembentukan metabolit sekunder (Wattimena, 1991).

Menurut Tabata (1977), keuntungan produksi metabolit sekunder melalui kultur *in vitro* tumbuhan adalah sebagai berikut :

1. Melalui kultur jaringan tumbuhan dapat dibentuk senyawa yang bermanfaat dalam kondisi terkontrol dan dalam waktu yang relatif lebih singkat.
2. Sel-sel tumbuhan dapat diperbanyak dengan mudah untuk memperoleh metabolit tertentu.
3. Pertumbuhan sel secara otomatis terawasi dan proses metabolisme dapat diatur secara rasional.
4. Hasil produksi yang diperoleh lebih konsisten, baik dalam kualitas maupun kuantitas.
5. Melalui kultur jaringan tumbuhan dapat dibentuk senyawa baru yang tidak terdapat dalam tanaman induknya dan senyawa baru ini mungkin berguna untuk dikembangkan atau dimanfaatkan lebih jauh.
6. Kultur tidak bergantung pada kondisi lingkungan seperti keadaan geografis, iklim, musim dan tidak memerlukan lahan yang luas.

D. Senyawa Flavonoid, Sintesis Flavonoid dan Fungsinya

Flavonoid adalah salah satu kelompok metabolit sekunder dan merupakan salah satu golongan senyawa fenol terbesar yang dihasilkan secara alami oleh tumbuh-tumbuhan. Kemungkinan keberadaannya dalam daun dipengaruhi oleh adanya proses fotosintesis sehingga daun muda belum terlalu banyak mengandung flavonoid (Markham, 1988).

Diperkirakan sekitar 2% dari seluruh karbon yang difotosintesis oleh tumbuh-tumbuhan (atau kira-kira 1×10^9 ton/tahun) diubah menjadi

flavonoid dan turunannya (Natori, 1981). Sebagian besar tanin juga berasal dari flavonoid. Flavonoid terdapat di dalam semua tumbuhan darat, tetapi tidak ditemukan pada tumbuhan laut (alga), mikroorganisme, bakteri, jamur dan lumut (Schener, 1978). Kebanyakan warna tumbuhan disebabkan oleh flavonoid, mulai dari zat warna fungus sampai angiospermae. Pada tumbuhan tinggi, flavonoid terdapat baik dalam bagian vegetatif maupun dalam bunga (Sabirin, 2004). Secara kuantitatif jumlah flavonoid yang dihasilkan oleh tumbuh-tumbuhan relatif sangat kecil, sehingga bila diisolasi akan memerlukan banyak tumbuhan. Karena itu, produksi flavonoid dengan cara isolasi dari alam kurang menguntungkan (Sabirin, 2004).

Flavonoid merupakan pigmen tumbuhan dengan warna kuning, kuning jeruk, dan merah. Senyawa ini dapat ditemukan pada buah, sayuran, kacang, biji, batang, bunga, herba, rempah-rempah, serta produk pangan dan obat dari tumbuhan seperti minyak zaitun, teh, cokelat, anggur merah, dan obat herbal (Middleton dkk., 2000). Senyawa ini berperan penting dalam menentukan warna, rasa, bau, dan kualitas gizi makanan (Macheix dkk., 1990). Tumbuhan umumnya hanya menghasilkan senyawa flavonoid tertentu. Bagi tumbuhan, senyawa flavonoid berperan dalam pertahanan diri terhadap hama dan penyakit, interaksi dengan mikrobia, dormansi biji, pelindung terhadap radiasi sinar UV, molekul sinyal pada berbagai jalur transduksi, serta molekul sinyal pada polinasi dan fertilitas jantan (Setyawan dan Darusman, 2008).

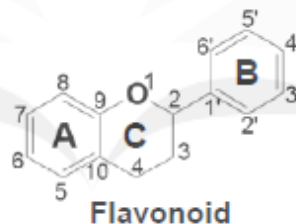
Sebagian besar flavonoid alami pada tumbuhan mengikat gula dan disebut flavonoid glikosida dan yang lainnya (sebagian kecil) tidak mengikat gula dan disebut flavonoid aglikon. Flavonoid glikosida larut di dalam pelarut polar (etanol, metanol, butanol, aseton, dimetilsulfoksida, dimetilformamida, air) dan mudah terhidrolisis menjadi aglikon yang tidak larut di dalam pelarut polar (Sabirin, 2004). Sebaliknya, aglikon yang kurang polar seperti isoflavan, flavanon, dan flavon serta flavonol yang termetoksilasi cenderung lebih mudah larut dalam pelarut seperti eter dan kloroform (Markham, 1988).

Penentuan flavonoid di dalam tumbuhan lebih baik dengan menguji keberadaan aglikon sebelum mempertimbangkan flavonoid glikosida (Sabirin, 2004). Analisis flavonoid lebih baik dengan memeriksa aglikon yang terdapat dalam ekstrak tumbuhan yang telah dihidrolisis sebelum memperhatikan kerumitan glikosida yang ada dalam ekstrak asal (Harborne, 1980). Flavonoid yang bersifat polar dapat menyerap gelombang radiasi pada daerah UV-Vis. Oleh karenanya, uji kualitatif flavonoid dapat digunakan KLT preparatif dengan fase diam polar dan spektrofotometer UV-Vis (Sjahid, 2008).

Flavonoid merupakan metabolit sekunder yang paling beragam dan tersebar luas. Sekitar 5-10% metabolit sekunder tumbuhan adalah flavonoid, dengan struktur kimia dan peran biologi yang sangat beragam (Macheix dkk., 1990). Senyawa ini dibentuk dari jalur shikimat dan fenilpropanoid (Harborne, 1989).

Kerangka dasar senyawa flavonoid sangat spesifik sehingga mudah dikenal. Kerangka dasar senyawa ini memiliki atom karbon sebanyak lima belas (C15), terdiri dari dua inti fenol (C6) yang dihubungkan oleh satu unit tiga karbon (C3). Kelima belas atom karbon pada kerangka dasar tersebut secara umum ditulis C6-C3-C6 dan dibagi menjadi empat tipe yaitu khalkon, flavon, isoflavon dan auron. Antara satu tipe dengan tipe yang lain hanya dibedakan oleh unit C3 (Sabirin, 2004).

Flavonoid merupakan turunan fenol yang memiliki struktur dasar fenilbenzopiron (tokoferol) (Middleton dkk., 2000), dicirikan oleh kerangka 15 karbon (C6-C3-C6) yang terdiri dari satu cincin teroksigenasi dan dua cincin aromatis (Gambar 4).



Gambar 3. Struktur dasar flavanoid dan biflavanoid. Sistem cincin bisiklis dinamai cincin A dan C, sedangkan cincin unisiklis dinamai cincin B. Posisi angka pada masing-masing monomer dimulai dari cincin yang mengandung atom oksigen, posisi ke-9 dan ke-10 menunjukkan karbon pada titik penyatuan (Rahman dkk., 2007).

Substitusi gugus kimia pada flavonoid umumnya berupa hidroksilasi, metoksilasi, metilasi dan glikosilasi (Harborne, 1980). Klasifikasi flavonoid sangat beragam, di antaranya ada yang mengklasifikasikan flavonoid menjadi flavon, flavanon, isoflavon, flavanol, flavanon, antosianin, dan kalkon (Ferreira dkk., 1999). Lebih dari 6467 senyawa flavonoid telah diidentifikasi

dan jumlahnya terus meningkat (Harborne dan Baxter, 1999). Kebanyakan flavonoid berbentuk monomer, tetapi terdapat pula bentuk dimer (biflavonoid), trimer, tetramer, dan polimer (Perruchon, 2004).

Bagi manusia, flavonoid berguna sebagai antioksidan, antimikrobia, antibakteri, antivirus, antiinflamasi, antialergi, antimutagenik, antikanker, antiplatelet dan lain-lain. Di sisi lain dilaporkan pula bahwa flavonoid dapat menyebabkan kerusakan DNA, mutasi dan apoptosis. Kajian terhadap flavonoid tidak hanya karena peran biologinya, tetapi lebih karena potensinya sebagai obat (Setyawan dan Darusman, 2008). Semakin banyak substitusi gugus hidroksi pada flavonoid, maka aktivitas antiradikalnya semakin besar. Flavonoid dapat berperan langsung sebagai antibakteri karena senyawa ini dapat mendenaturasi protein sel bakteri dan merusak membran sel tanpa dapat diperbaiki lagi (Pelczar dan Chan, 1988).

Flavonoid merupakan senyawa pereduksi yang baik, menghambat banyak reaksi oksidasi, baik secara enzim maupun non enzim. Flavonoid bertindak sebagai penampung yang baik terhadap radikal hidroksi dan superoksida dengan demikian dapat melindungi lipid membran terhadap reaksi yang merusak. Aktivitas antioksidannya dapat menjelaskan mengapa flavonoid tertentu merupakan komponen aktif tumbuhan yang digunakan secara tradisional untuk mengobati gangguan fungsi hati (Robinson, 1991).

Antioksidan merupakan senyawa yang akan menghambat atau menunda proses oksidasi substrat pada konsentrasi yang rendah (Vaya dan Aviram, 2001). Secara umum, antioksidan mengurangi kecepatan reaksi

inisiasi pada reaksi berantai pembentukan radikal bebas dalam konsentrasi yang sangat kecil, yaitu 0,01% atau bahkan kurang. Karakter utama senyawa antioksidan adalah kemampuannya untuk menangkap radikal bebas (Pratimasari, 2009).

Senyawa-senyawa golongan flavonoid dapat mengalami peningkatan karena pengaruh cahaya. Cahaya dalam proses fotosintesis akan menghasilkan glukosa-6-fosfat sebagai prekursor pembentukan asetil CoA yang selanjutnya menghasilkan senyawa-senyawa flavonoid termasuk antosianin (Vickery dan Vickery, 1981). Konsentrasi total flavonoid pada kulit buah apel mengalami peningkatan pada level cahaya yang berbeda sampai sekitar 50% dari cahaya matahari penuh (Jackson, 1980; Barritt dkk., 1997).

E. Medium Kultur Jaringan

Keberhasilan penggunaan metode kultur *in vitro* juga sangat tergantung pada medium yang digunakan. Medium kultur *in vitro* tanaman tidak hanya menyediakan unsur hara makro dan mikro tetapi juga karbohidrat. Umumnya berupa gula untuk menggantikan karbon yang biasanya didapat dari atmosfer melalui fotosintesis. Penggunaan larutan garam-garam makro dengan konsentrasi rendah lebih baik daripada larutan dengan konsentrasi tinggi (Herawan dan Na'iem, 2006).

Medium yang sering digunakan untuk kultur *in vitro* adalah medium MS yang terdiri dari unsur makro dan mikro yang menunjang pertumbuhan

tanaman, selain itu juga terdapat unsur tambahan seperti vitamin dan ZPT (Lampiran 2). Medium MS layak untuk memenuhi kebutuhan banyak jenis sel tanaman dalam kultur (Gunawan, 1992).

Setiap tanaman membutuhkan paling sedikit 16 unsur hara untuk pertumbuhannya yang normal. Tiga unsur diantaranya adalah C, H, O yang diambil dari udara, sedangkan 13 unsur yang lain berupa pupuk yang dapat diberikan melalui akar atau melalui daun. Semua unsur tersebut dibutuhkan oleh tanaman untuk pertumbuhannya. Ada unsur yang dibutuhkan tanaman dalam jumlah besar yang disebut unsur makro, ada pula yang dibutuhkan oleh tanaman dalam jumlah sedikit tetapi harus tersedia yang disebut unsur mikro (Suryowinoto, 1991).

Selain unsur hara, biasanya juga ditambahkan zat-zat organik ke dalam medium kultur *in vitro* seperti sukrosa, mio inositol, asam amino dan ZPT. Sedangkan sebagai tambahan biasanya diberi zat organik lain seperti air kelapa, ekstrak ragi, pisang, tomat, tauge dan lain-lain (Suryowinoto, 1991).

F. Zat Pengatur Tumbuh Asam 2,4-Diklorofenoksiasetat

Zat Pengatur Tumbuh pada tanaman merupakan senyawa organik bukan hara yang dalam jumlah sedikit dapat mendukung, menghambat dan mengubah proses fisiologis tanaman. ZPT yang sering digunakan yaitu golongan auksin dan sitokinin (Hendaryono dan Wijayani, 1994). Auksin merupakan salah satu hormon tumbuh yang tidak terlepas dari proses pertumbuhan dan perkembangan suatu tanaman. Secara umum auksin

mempunyai efek merangsang pemanjangan sel terutama sel batang dan koleoptil. Auksin dalam konsentrasi tinggi dapat menghambat pertumbuhan mata tunas (Audus, 1972).

Pada aktivitas kultur jaringan, auksin sangat berperan menginduksi terjadinya kalus, menghambat kerja sitokinin membentuk klorofil dalam kalus, mendorong proses morfogenesis kalus membentuk akar atau tunas, mendorong proses embriogenesis, serta mempengaruhi kestabilan genetik sel tanaman. ZPT yang termasuk kelompok auksin adalah *Indole Acetic Acid* (IAA), *Indole Butyric Acid* (IBA), *Napthalene Acetic Acid* (NAA) dan *2,4 Dichlorophenoxyacetic Acid* (2,4 D) (Audus, 1972).

Auksin memberikan pengaruh terhadap perkembangan sel karena auksin dapat menaikkan tekanan osmotik, meningkatkan permeabilitas sel, meningkatkan sintesis protein, meningkatkan plastisitas dan pengembangan dinding sel (Abidin, 1990). Auksin merupakan hormon yang diproduksi secara alamiah dalam tubuh tanaman. Auksin banyak digunakan dalam kerja mikropropagasi dan bekerja sama dengan medium makanan (nutrien) untuk memelihara pertumbuhan kalus, suspensi sel atau organ (seperti meristem, tunas dan ujung akar) dan mengatur morfogenesis (Katuuk, 1989). Menurut Lakitan (1996), pengaruh ZPT tergantung pada kondisi anatomi dan fisiologi dari sel yang dipengaruhi dan tidak semua sel menjadi sasaran hormon tertentu.

Asam 2,4-Diklorofenoksiasetat merupakan golongan auksin yang sering digunakan untuk menginduksi pembentukan kalus embriogenik.

Hormon ini mempunyai sifat lebih stabil karena tidak mudah terurai oleh enzim-enzim yang dikeluarkan oleh sel atau saat pemanasan pada proses sterilisasi, lebih tersedia, lebih murah dan paling efektif dalam memacu pembentukan kalus (Hendaryono dan Wijayani, 1994). Menurut Gati dan Mariska (1992), 2,4-D efektif untuk memacu pembentukan kalus dari *Mentha piperita* Linn. karena aktivitasnya yang kuat untuk memacu proses dediferensiasi sel, menekan organogenesis serta menjaga pertumbuhan kalus.

Auksin 2,4-D lebih efektif dibandingkan dengan auksin yang lain untuk meningkatkan perkembangan dan proliferasi kultur embriogenik. 2,4-D mendorong pertumbuhan embrio somatik dari embriogenesis. 2,4-D pada konsentrasi rendah akan menginduksi terbentuknya kalus, namun pada konsentrasi tinggi akan menyebabkan timbulnya mutasi karena 2,4-D bersifat herbisida dan akan menyebabkan perubahan jaringan tanaman (Goldsworthy dan Mina, 1991).

Pemakaian ZPT asam 2,4-D biasanya digunakan dalam jumlah kecil dan dalam waktu yang singkat, antara 2-4 minggu karena merupakan auksin kuat, artinya auksin ini tidak dapat diuraikan di dalam tubuh tanaman (Hendaryono dan Wijayani, 1994). Konsentrasi hormon yang diberikan bervariasi tergantung jenis tanaman, misalnya konsentrasi 2,4-D yang biasa digunakan pada tanaman monokotil adalah 2,0-10 mg/L dan konsentrasi 2,4-D pada tanaman dikotil yang menunjukkan pertumbuhan kalus adalah 0,001-2,0 mg/L (George dan Sherrington, 1984).

Menurut Rahayu dkk. (2003), dalam sintesis flavonoid auksin berfungsi untuk meningkatkan kerja enzim PAL yang menghasilkan sinamat dari fenilalanin. Jalur berikutnya yaitu pembentukan flavonoid dari malonil Co-A, apabila auksin berkurang maka pembentukan flavonoid juga berkurang. Robbins dkk., (1992) mengemukakan bahwa untuk menghasilkan senyawa fenol secara *in vitro* selain diperlukan penambahan zat pengatur tumbuh, juga perlu ditambahkan unsur lain seperti kasein hidrolisis, asam amino, dan NH_4NO_3 untuk membantu pertumbuhan kalus dan produksi senyawa kimia.

G. Asam Amino Fenilalanin

Pembentukan kalus embriogenik ditentukan oleh sumber N pada medium. Asam amino merupakan sumber N-organik yang lebih cepat dapat diserap tanaman daripada N-anorganik. Penambahan asam amino seperti glutamin, casein hidrolisat, dan arginin pada medium yang sudah mengandung auksin dapat meningkatkan keberhasilan pembentukan kalus embriogenik, karena dalam kloroplas asam amino dapat berperan sebagai prekursor untuk pembentukan asam nukleat dan proses seluler lainnya (Gunawan, 1992).

Fenilalanin merupakan salah satu asam amino yang termasuk dalam golongan asam amino aromatik yang bersifat hidrofobik. Rantai samping aromatiknya membuat fenilalanin dapat berinteraksi kuat dengan rantai samping aromatik senyawa lainnya. Fenilalanin dapat disubstitusi dengan

asam amino aromatik atau asam amino hidrofobik lain seperti dengan tirosin dimana letak perbedaan hanya pada adanya gugus hidroksil pada cincin benzena tirosin. Rantai samping fenilalanin bersifat non-reaktif, maka dari itu fenilalanin jarang terlibat langsung dalam fungsi protein meskipun dapat berperan dalam pengenalan substrat. Residu aromatiknya dapat berinteraksi dengan senyawa non-protein bila senyawa tersebut memiliki gugus aromatik (Betts dan Russell, 2003).

Flavonoid berasal dari fenilalanin, yaitu sebuah prekursor metabolik *upstream* pada jalur pembentukan fenilpropanoid. Berdasarkan hal tersebut maka suplementasi berupa fenilalanin diharapkan dapat memacu reaksi metabolik melalui jalur biosintetis fenilpropanoid dan meningkatkan jumlah dari komponen target. Suplementasi fenilalanin telah dilaporkan dapat memacu produksi metabolit sekunder dalam kultur sel tanaman (Shinde dkk., 2009).

H. Ekstraksi dan Analisis Kandungan Flavonoid

Analisis kualitatif pada tumbuhan meliputi dua tahapan yaitu isolasi/ ekstraksi dan identifikasi kandungan sekunder dalam jenis tumbuhan khusus. Analisis ini juga digunakan untuk menentukan ciri senyawa aktif penyebab efek racun atau efek yang bermanfaat. Pengambilan bahan aktif dari suatu tanaman, dapat dilakukan dengan ekstraksi. Dalam proses ekstraksi ini, bahan aktif akan terlarut oleh zat penyari yang sesuai sifat kepolarannya. Metode ekstraksi dipilih berdasarkan beberapa faktor seperti sifat dari bahan mentah

obat, daya penyesuaian dengan tiap macam metode ekstraksi dan kepentingan dalam memperoleh ekstrak yang sempurna atau mendekati sempurna (Ansel, 1989).

Menurut Markham (1988), untuk mendapatkan ekstrak flavonoid sebaiknya dilakukan ekstraksi soxhletasi menggunakan pelarut metanol : air (9 : 1). Senyawa flavonoid pada umumnya mudah larut dalam air, terutama bentuk glikosidanya. Senyawa tersebut dapat diekstrak menggunakan pelarut air. Senyawa yang sedikit larut dalam air bersifat semi-polar dan dapat diekstraksi dengan pelarut metanol 80%, aseton dan etanol (Robinson, 1991).

Analisis kualitatif flavonoid dapat dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Spektrum serapan ultra violet dan serapan tampak merupakan cara tunggal yang paling bermanfaat untuk mengidentifikasi struktur flavonoid (Markham, 1988). Flavonoid mengandung sistem aromatis yang terkonjugasi dan dapat menunjukkan pita serapan kuat pada daerah UV-Vis (Rohyami, 2007). Metode tersebut juga dapat digunakan untuk melakukan uji secara kuantitatif untuk menentukan jumlah flavonoid (Slimestad dkk., 2005).

Spektrofotometri UV-Vis adalah salah satu teknik analisis spektroskopik yang memakai sumber radiasi elektromagnetik ultra violet dekat (190-380 nm) dan sinar tampak (380-780) dengan memakai instrumen spektrofotometer. Spektrofotometri UV-Vis melibatkan energi elektronik yang cukup besar pada molekul yang dianalisis, sehingga spektrofotometri

UV-Vis lebih banyak dipakai untuk analisis kuantitatif dibandingkan kualitatif (Mulja dan Suharman, 1995).

Suatu molekul hanya menyerap radiasi elektromagnetik dengan panjang gelombang yang khusus (spesifik untuk molekul tersebut), absorpsi cahaya ultraviolet (radiasi berenergi tinggi) mengakibatkan pindahnya sebuah elektron ke orbital dengan energi yang lebih tinggi (Fessenden dan Fessenden, 1997). Molekul-molekul yang memerlukan lebih banyak energi untuk promosi elektron, akan menyerap pada panjang gelombang yang lebih pendek. Molekul yang memerlukan energi yang lebih sedikit akan menyerap pada panjang gelombang yang lebih panjang. Senyawa yang menyerap cahaya dalam daerah visible (yakni senyawa berwarna) mempunyai elektron yang lebih mudah dipromosikan daripada senyawa yang menyerap pada panjang gelombang UV (Skoog, 1985).

Spektrofotometer UV-Vis dapat digunakan untuk membantu mengidentifikasi jenis flavonoid dan menentukan pola oksigenasi. Di samping itu, kedudukan gugus hidroksil fenol bebas pada inti flavonoid dapat ditentukan dengan menambahkan pereaksi diagnostik ke dalam larutan cuplikan dan mengamati pergeseran puncak serapan yang terjadi. Dengan demikian, secara tidak langsung cara ini berguna untuk menentukan kedudukan gula atau metal yang terikat pada salah satu gugus hidroksi fenol (Markham, 1988).

I. Hipotesis

- a. Kalus yang dihasilkan dari kultur *in vitro* krisan cv. Puspita Pelangi dapat menghasilkan flavonoid.
- b. Eksplan daun lebih baik daripada batang bagi induksi kalus dan produksi flavonoid dari krisan cv. Puspita Pelangi.
- c. Semakin tinggi kandungan 2,4-D dalam medium maka kandungan flavonoid yang dihasilkan juga akan semakin tinggi.
- d. Konsentrasi hormon 2,4-D yang optimal bagi induksi kalus dan produksi senyawa flavonoid adalah 3,0 mg/L.