II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Cabai Rawit (*Capsicum frutescens*) Putih

Tanaman cabai berasal dari dari daerah tropik dan subtropik Benua Amerika, khususnya Colombia, Amerika Selatan, dan terus menyebar ke Amerika Latin. Penyebaran cabai ke seluruh dunia termasuk negara-negara di Asia, seperti Indonesia dilakukan oleh pedagang Spanyol dan Portugis. Diperkirakan terdapat 20 spesies cabai yang sebagian besar hidup dan berkembang di Benua Amerika, tetapi masyarakat Indonesia umumnya hanya mengenal beberapa jenis saja, yakni cabai besar, cabai keriting, cabai rawit, dan paprika (Harpenas dan Dermawan, 2010). Tiap jenis cabai mempunyai tingkat kepedasan yang berbeda. Hal ini ditunjukkan dengan kandungan capsaicin buah cabai tiap jenis juga berbeda (Tabel 1) (Sukrasno dkk., 1997).

Tabel 1. Kandungan Capsaicin Cabai

Nama Lokal	Nama Ilmiah	Kandungan Capsaicin (mg/g berat kering)
Cabai Rawit Putih	*Capsicum frutescens*	13,5
Cabai Rawit Ceplik	*Capsicum frutescens*	3,5
Cabai Rawit Ceplik Hijau	*Capsicum frutescens*	1,0
Cabai Besar	*Capsicum annuum*	0,7
Cabai Keriting	*Capsicum annuum*	2,9
Cabai Merah Keriting	*Capsicum annuum*	4,6
Cabai Merah	*Capsicum annuum*	0,2
Cabai Hijau	*Capsicum annuum*	0,3
Paprika	*Capsicum annuum*	0,0

(Sumber: Sukrasno dkk., 1997)

Menurut Cahyono (2003), kedudukan tanaman cabai rawit sebagai berikut:

Divisi	: Spermathophyta (tumbuhan berbiji)
Subdivisi	: Angiospermae (biji berada di dalam buah)
Kelas	: Dicotyledoneae (biji berkeping dua)
Bangsa	: Corolliforea
Suku	: Solanaceae
Marga	: *Capsicum*
Jenis	: *Capsicum frutescens*

Capsicum frutescens L. yang mempunyai sinonim *Capsicum fastigiatum* BI. dan *Capsicum minimum* Roxb merupakan tanaman budidaya yang digunakan sebagai tanaman sayuran (Dalimartha, 2006). Tanaman cabai rawit tergolong tanaman semusim atau tanaman berumur pendek yang tumbuh sebagai perdu atau semak (Cahyono, 2003).

Batang tanaman cabai rawit memiliki struktur yang keras dan berkayu, berwarna hijau gelap, berbentuk bulat, halus, dan bercabang banyak. Batang utama tumbuh tegak dan kuat. Percabangan terbentuk setelah batang tanaman mencapai ketinggian berkisar 30 cm – 45 cm. Cabang tanaman beruas-ruas, setiap ruas ditumbuhi daun dan tunas (cabang). Daun cabai rawit berbentuk bulat telur dengan ujung runcing dan tepi daun rata (tidak bergerigi atau berlekuk). Daun berupa daun tunggal dengan kedudukan agak mendatar, memiliki tulang daun menyirip, dan tangkai tunggal yang melekat pada batang atau cabang. Bunga tanaman cabai rawit merupakan bunga tunggal yang berbentuk bintang. Bunga tumbuh menunduk pada ketiak daun, dengan mahkota berwarna putih. Penyerbukan bunga termasuk sendiri (*self*

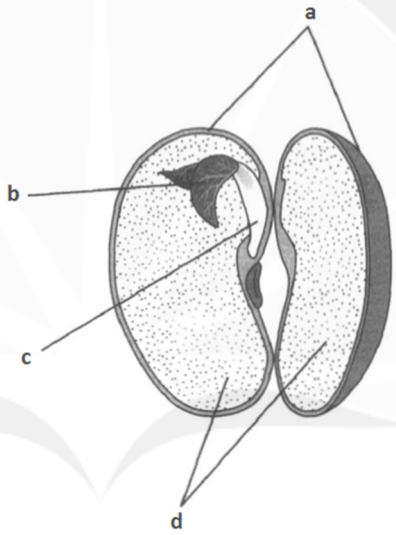
pollinated crop), tetapi dapat juga terjadi secara silang dengan keberhasilan sekitar 56% (Cahyono, 2003).

Buah cabai rawit terbentuk setelah terjadi penyerbukan. Buah memiliki keanekaragaman dalam hal ukuran, bentuk, warna, dan rasa. Buah cabai rawit dapat berbentuk bulat pendek dengan ujung runcing atau berbentuk kerucut. Ukuran buah bervariasi, menurut jenisnya. Cabai rawit yang kecil-kecil memiliki ukuran antara 2 cm – 2,5 cm dan lebar 5 mm, sedangkan cabai rawit agak besar memiliki ukuran panjang mencapai 3,5 cm dan lebar mencapai 12 mm. Biji cabai rawit berwarna putih kekuning-kuningan, berbentuk bulat pipih, tersusun berkelompok (bergerombol), dan saling melekat pada empulur. Perakaran tanaman cabai rawit terdiri atas akar tunggang yang tumbuh lurus ke pusat bumi dan akar serabut yang tumbuh menyebar ke samping (horizontal). Perakaran tanaman tidak dalam sehingga tanaman hanya dapat tumbuh dan berkembang baik pada tanah yang gembur, *porous* (mudah menyerap air), dan subur (Cahyono, 2003).

Menurut Cahyono (2003), cabai rawit memiliki tiga jenis, yaitu cabai kecil, cabai ceplik, dan cabai putih. Jenis cabai putih memiliki ciri-ciri buah berbentuk bulat agak lonjong (gemuk) dan berukuran besar, dengan panjang mencapai 3 cm atau lebih dan lebar 13 mm atau lebih, serta berat rata-rata 2,5 g. Saat masih muda berwarna putih, berubah menjadi merah jingga (merah agak kuning) bila telah matang.

B. Hipokotil

Kecambah biji dikotil memiliki dua bagian, yaitu epikotil (Gambar 1) dan hipokotil (Gambar 1 dan Gambar 2). Epikotil merupakan bagian perpanjangan kotiledon bagian atas, sedangkan hipotil merupakan bagian perpanjangan kotiledon bagian bawah. Epikotil akan membentuk batang dan hipokotil akan membentuk akar. Hipokotil juga dapat berkembang membentuk batang (Schooley, 1997).



Gambar 1. Morfologi hipokotil kecambah biji dikotiledon
(Sumber: Schooley, 1997)
Keterangan: a = kulit biji; b = epikotil; c = hipokotil; d kotiledon

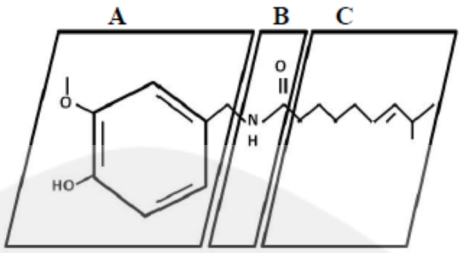
Gambar 2. Morfologi hipokotil kecambah secara umum
(Sumber: Taiz and Zeiger, 2002)
Keterangan: a = hipokotil

C. Metabolit Sekunder Capsaicin dan Biosintesisnya

Tumbuhan tidak hanya melakukan metabolisme primer, tetapi juga melakukan metabolisme sekunder menggunakan jalur metabolisme tertentu yang akan menghasilkan pembentukan senyawa kimia khusus yang disebut metabolit sekunder (Herbert, 1995). Karakteristik metabolit sekunder adalah struktur kimianya heterogen dan terbentuk hanya pada kelompok makhluk hidup bahkan jenis tertentu. Metabolit yang diproduksi oleh tumbuhan tersebut memiliki nilai penting dalam berbagai industri, khususnya bahan baku industri farmasi, penyedap makanan, dan parfum (Khadi *et al*., 1981).

Produk metabolit sekunder yang terdapat pada buah cabai salah satunya adalah capsaicin. Capsaicin merupakan kelompok senyawa yang bertanggung jawab terhadap rasa pedas dari cabai (Sukrasno dkk., 1997). Capsaicin merupakan senyawa nonpolar yang memiliki beberapa gugus polar terhadap hidrogen yang berikatan dengan air. Hal ini menyebabkan capsaicin tidak larut dalam air (Cairns, 2004).

Menurut Reyes-Escogido *et al*. (2011), capsaicin (trans-8-metil-N-vanilil-6-noneamida) merupakan alkaloid berbentuk kristal, lipofilik, tak berwarna, tak berbau dengan rumus molekul $C_{18}H_{27}NO_3$. Berat molekul capsaicin 305,4 g/mol. Capsaicin larut dalam lemak dan alkohol. Pertama dikristalkan pada tahun 1876 oleh Tresh. Struktur molekul ditemukan oleh Nelson dan Dawson pada tahun 1919. Capsaicin mempunyai isomer cis/trans seperti terlihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Molekul capsaicin (Sumber: Reyes-Escogido *et al*., 2011)
Keterangan: A = cincin aromatik, B = ikatan amida, C = rantai samping hidrofobik)

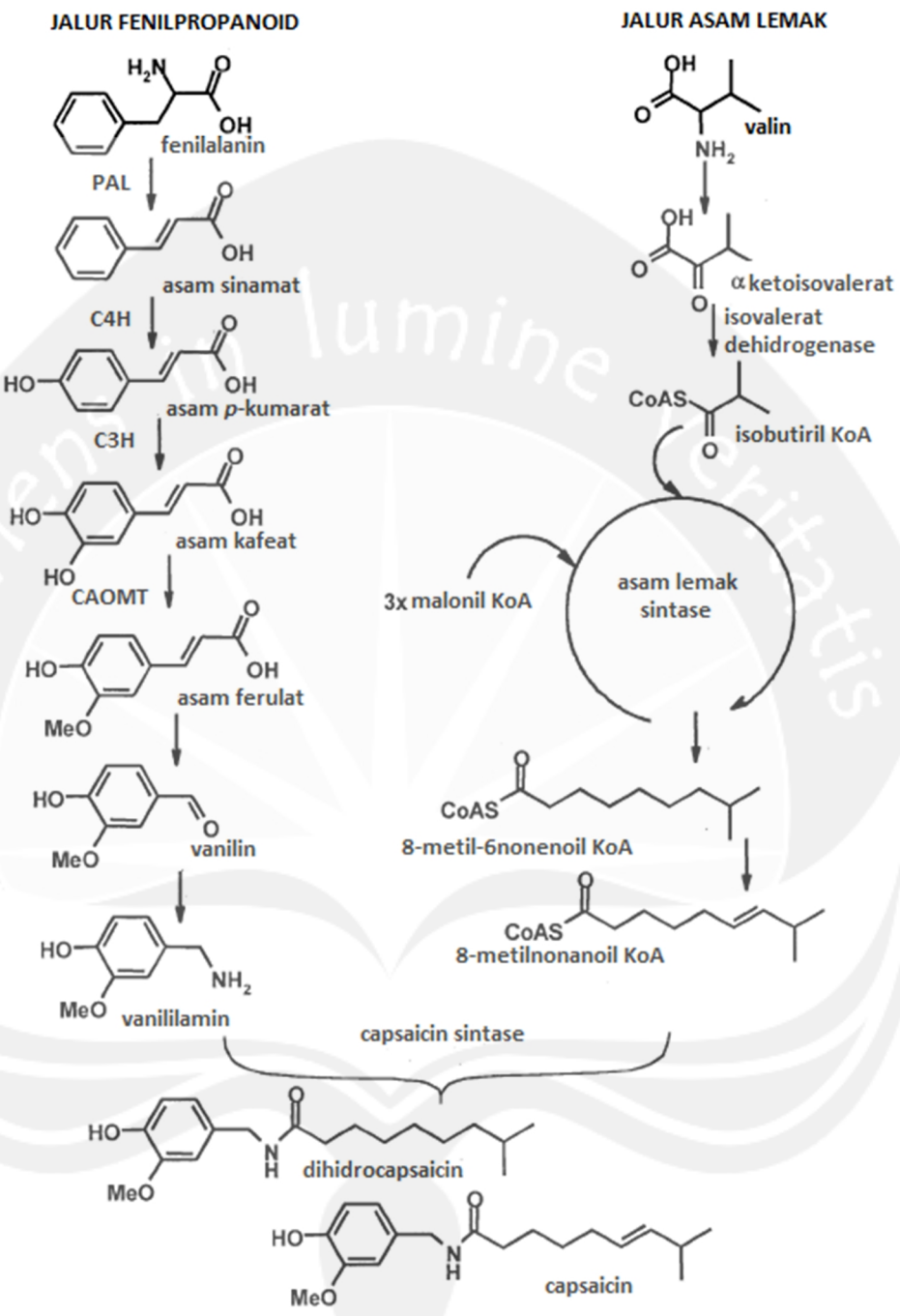
Biosintesis capsaicin (Gambar 4) dibagi dalam dua jalur, metabolisme asam lemak yang menentukan molekul asam lemak dan fenilpropanoid yang menentukan struktur fenolik (Ochoa-Alejo, and Gómez-Peralta, 1993). Terdapat empat enzim yang berpengaruh pada biosintesis capsaicin pada jalur fenilpropanoid: fenilalanin amonia liase (*phenylalanine ammonia-lyase* / PAL), asam sinamat-4-hidroksilase (*cinnamic acid-4-hydroxylase* / C4H), ρ-asam kumarat-3-hidroksilase (*ρ-coumaric acid-3-hydroxylase* / C3H), dan asam kafeat-*o*-metitransferase (*caffeic acid-o-methytransferase* / CAOMT) (Fujiwake *et al*., 1982). Capsaicin disintesis melalui kondensasi enzimatik dari vanililamin dan asam lemak rantai panjang, kemudian capsaicin sintase (*capsaicin synthase* / CS) bekerja secara spesifik pada asam lemak rantai panjang yang mengandung Mg^{2+}, ATP, dan koenzim A (*coenzymeA* /CoA) (Reyez-Escogido *et al*., 2011).

Fenilalanin amonia-liase (PAL) merupakan enzim kunci pada biosintesis capsaicin jalur fenilpropanoid. Aktivitas PAL meningkat menyebabkan terjadinya degradasi fenilalanin, peningkatan konsentrasi asam sinamat dan capsaicinoid (Ochoa-Alejo, and Gómez-Peralta, 1993). Enzim

C4H akan menghidrolasi asam sinamat menjadi asam ρ-kumarat. Kemudian biosintesis capsaicin berujung pada kerja CS yang menggabungkan vanililamin 8-metilnonanoil KoA untuk menghasilkan capsaicin (Fujiwake *et al*., 1982).

Capsicum annuum L. var. *annuum* yang ditumbuhkan secara *in vivo* pada lahan yang kekurangan air memiliki kadar capsaicin yang lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan kontrol. Perlakuan kekurangan air tersebut menyebabkan meningkatnya aktivitas C4H. Aktivitas C4H ini berbanding lurus dengan aktivitas CS. Semakin tinggi aktivitas C4H, semakin tinggi pula aktivitas CS untuk membentuk capsaicin (Sung *et al*., 2005).

Menurut Astawan dan Kasih (2008), capsaicin bersifat antikoagulan, dengan cara menjaga darah tetap encer dan mencegah terbentuknya kerak lemak pada pembuluh darah. Kegemaran makan sambal memperkecil kemungkinan menderita penyumbatan pembuluh darah (aterosklerosis), sehingga mencegah munculnya serangan *stroke*, jantung koroner, dan impotensi. Adapun, menurut Harpenas dan Dermawan (2010), capsaicin bisa menumpulkan saraf tepi sehingga berfungsi untuk antialergi. Capsaicin dapat mengeluarkan lendir dari paru-paru (zat *mucokinetic*), dengan demikian cabai membantu menyembuhkan bronkitis, influenza, sinusitis, dan asma. Capsaicin juga dapat menghalangi bahaya pada sel *trachea*, *bronchial*, dan *bronchoconstriction* yang disebabkan oleh asap rokok dan polutan lainnya.



Gambar 4. Biosintesis capsaicin melalui jalur fenilpropanoid dan jalur metabolisme asam lemak (Sumber: Blum *et al*., 2003)

Keterangan: PAL = fenilalanin amonia liase; C4H = asam sinamat-4-hidroksilase; C3H = ρ-asam kumarat-3-hidroksilase; CAOMT = asam kafeat-*o*-metitransferase

D. Kultur *In Vitro* untuk Menghasilkan Metabolit Sekunder

Kultur *in vitro* merupakan suatu metode untuk mengisolasi bagian dari tanaman seperti sel, sekelompok sel, jaringan, organ, protoplas serta menumbuhkannya dalam kondisi aseptik sehingga bagian-bagian tersebut dapat memperbanyak diri dan beregenerasi menjadi tanaman lengkap kembali (Soecipto, 1994). Kultur *in vitro* termasuk teknik perbanyakan tanaman secara vegetatif buatan berdasarkan pada sifat totipotensi tumbuhan. Totipotensi adalah kemampuan beberapa sel tanaman yang masih dalam proses pertumbuhan. Untuk mendukung keberhasilan kultur *in vitro*, tanaman yang akan dikulturkan berupa jaringan muda yang dalam kondisi tumbuh, seperti pucuk tanaman, daun muda, akar, dan tunas (Rahardja dan Wiryanta, 2005).

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).

Kultur *in vitro* dapat digunakan untuk memproduksi metabolit sekunder sebagai sumber aroma dan wangi-wangian, rasa, *bioplastic* dan *biofuel*, enzim, kosmetik, pewarna alami, dan komponen bioaktif

(Karuppusamy, 2009). Menurut Tabata (1977), keuntungan produksi metabolit sekunder melalui kultur *in vitro* tumbuhan adalah sebagai berikut:

1. Melalui kultur *in vitro* 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 *in vitro* 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.

E. Kalus

Kalus 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).

Kalus dapat diinisiasi dari hampir semua bagian tanaman, tetapi organ yang berbeda menunjukkan kecepatan pembelahan sel yang berbeda pula. Jaringan-jaringan yang sedang aktif membelah pada awal masa pertumbuhan biasanya merupakan eksplan yang baik. Bagian tanaman seperti embrio muda, hipokotil, kotiledon, batang muda merupakan bagian yang mudah untuk diferensiasi dan menghasilkan kalus (Hartman *et al*., 1990).

Beberapa kalus ada yang mempunyai struktur yang keras dan kompak. Kalus yang tumbuh terpisah-pisah menjadi bagian-bagian yang kecil, kalus ini dikenal dengan kalus remah (George and Sherrington, 1984). Keseimbangan nutrisi dalam media tumbuh sangat memengaruhi pertumbuhan kalus maupun diferensiasinya membentuk tunas. Morfogenesis eksplan tergantung kepada keseimbangan auksin dan sitokinin di dalam media dan interaksi antara zat pengatur tumbuh endogen di dalam tanaman dan zat pengatur tumbuh eksogen yang diserap dari media tumbuh (Wattimena, 1991). Terbentuknya kalus disebabkan adanya penambahan zat pengatur tumbuh eksogen (Sudirga, 2002).

Menurut Hendaryono dan Wijayani (1994), kondisi warna kalus yang bervariasi 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).

F. Medium Kultur *In Vitro* dan Potensial Air

Keberhasilan penggunaan metode kultur *in vitro* juga sangat tergantung pada media yang digunakan. Media 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 fotosintesa (Herawan dan Na'iem, 2006). Menurut Gamborg and Shyluk (1981), medium dasar yang banyak digunakan adalah MS karena komposisi garamnya sesuai untuk morfogenesis, kultur meristem dan regenerasi tanaman. Komposisi medium MS dapat dilihat pada Lampiran 1.

Potensi kimia suatu zat adalah energi bebas setiap mol zat itu dan merupakan energi yang menyebabkan zat itu bereaksi atau bergerak. Potensi kimia suatu zat meningkat dengan naiknya konsentrasi partikel-partikel. Tegangan larutan cair dipengaruhi oleh adanya partikel-partikel bahan terlarut yang larut di dalamnya. Salah satu efek penambahan bahan terlarut ialah pengurangan jumlah partikel air per satuan volume sehingga potensi gerakan air bergantung pada jumlah partikel yang bergerak per satuan volume, maka tegangannya juga menurun. Jadi, makin besar konsentrasi partikel-partikel bahan terlarut, makin rendahlah nilai tegangan (Loveless, 1991).

Menurut Salisbury dan Ross (2010), linarut (bahan terlarut) dalam suatu pelarut (cairan yang melarutkan linarut) mempunyai potensial kimia hampir sebanding dengan konsentrasi linarut. Potensial air suatu sistem atau bagian sistem yang mengandung air, atau dapat mengandung air, setara

dengan potensial kimia air murni, pada tekanan atmosfer dan pada suhu sama. Larutan yang lebih pekat mempunyai potensial air lebih rendah (lebih negatif).

Karbohidrat memerankan peran yang penting dalam kultur *in vitro* sebagai sumber energi dan sumber karbon. Komposisi lain penyusun medium adalah garam-garam anorganik. Garam-garam anorganik merupakan unsur hara makro dan unsur hara mikro. Karbohidrat dan garam-garam anorganik dalam medium memengaruhi potensial osmotik medium. Unsur hara makro memberikan kontribusi besar pada tekanan osmotik karena konsentrasi yang dibutuhkan juga lebih besar. Potensial osmotik meningkat mengakibatkan potensial air medium berkurang (George *et al*., 2008).

Menurut Kalidass *et al*. (2010), produksi metabolit sekunder pada kultur kalus dapat dikontrol melalui faktor lingkungannya, salah satunya adalah dengan memberi variasi pada komposisi medium. Variasi komposisi medium dapat menghasilkan biomassa kalus eksplan daun dan kandungan alkaloid yang tinggi. Penelitian Verma *et al*. (2012) menyebutkan bahwa medium 1 MS lebih efektif untuk pertumbuhan kalus dan kandungan alkaloid jika dibandingkan dengan medium ½ MS. Hal ini didukung oleh penelitian Kittipongpatana *et al*. (1998) yang menyebutkan medium 1 MS memberikan kontribusi terbesar terhadap produksi solasodin pada kultur kalus *Solanum aviculare*.

Kemampuan formula medium basal dalam mendukung pertumbuhan sel dan sintesis metabolit sekunder tanaman berkaitan dengan keseimbangan ionik pada medium. Penting untuk menemukan kadar nutrien medium yang

cocok karena konsentrasi nutrien yang rendah tidak cukup untuk mendukung pertumbuhan sel, sedangkan konsentrasi nutrien yang terlalu tinggi bersifat toksik dan menyebabkan *osmotic stress* (Drewes and Staden, 1995).

Sumber karbon pada medium memberikan pengaruh yang signifikan pada kultur kalus eksplan daun dan kandungan alkaloid pada penelitian Verma *et al.* (2012). Konsentrasi sumber karbon yang tinggi menghasilkan biomassa kalus dan kandungan total alkaloid yang tinggi pula. Penelitian Hilton and Rhodes (1994) menemukan bahwa peningkatan konsentrasi sukrosa menghasilkan peningkatan biomassa dan produksi alkaloid skopolamin. Hasil yang sama juga diperoleh Shaoxiong *et al*. (1996), yaitu peningkatan produksi alkaloid steroidal disebabkan oleh tingginya konsentrasi sukrosa pada medium.

G. Auksin dan Sitokinin

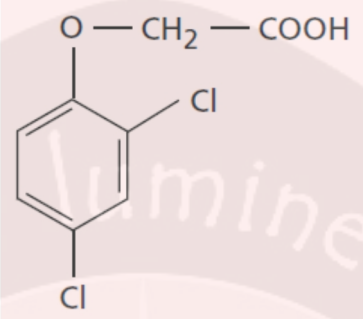
Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) pada tanaman merupakan senyawa organik bukan hara yang dalam jumlah sedikit dapat mendukung, menghambat dan mengubah proses fisiologis tanaman. Golongan ZPT yang sering digunakan yaitu golongan auksin dan sitokinin (Hendaryono dan Wijayani, 1994). Secara umum auksin mempunyai efek merangsang pemanjangan sel terutama sel batang dan koleoptil. Auksin dalam konsentrasi tinggi dapat menghambat pertumbuhan mata tunas. Hormon yang termasuk kelompok auksin adalah Asam Indol-3-Asetat (IAA), Asam Indol Butirat (IBA), Asam Naptalen Asetat (NAA) dan Asam 2,4-Diklorofenoksiasetat (2,4 D) (Audus, 1972).

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).

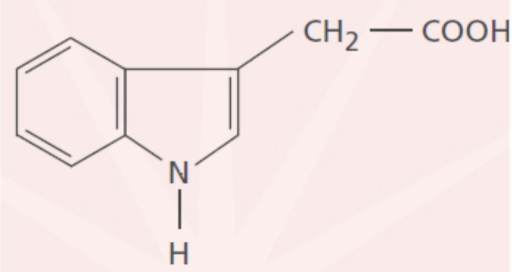
Zat pengatur tumbuh 2,4-D pada konsentrasi rendah akan menginduksi terbentuknya kalus, tetapi pada konsentrasi tinggi akan menyebabkan timbulnya mutasi karena 2,4-D bersifat toksik dan akan menyebabkan perubahan jaringan tanaman (Goldsworty and Mina, 1991). Asam 2,4-Diklorofenoksiasetat (2,4-D) merupakan 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 karena aktivitasnya yang kuat untuk memacu proses dediferensiasi sel, menekan organogenesis serta menjaga pertumbuhan kalus. Struktur kimia dari 2,4-D dapat dilihat pada Gambar 5.

Fritz Went mengisolasi auksin pada tahun 1928, kemudian F. Kogl mendefinisikan struktur molekul auksin tersebut sebagai Asam Indol Asetat (IAA) (Gambar 6). Struktur molekul IAA mirip dengan strutur molekul asam

amino triptofan. Kemiripan tersebut karena triptofan merupakan prekursor dari IAA (Schooley, 1997).

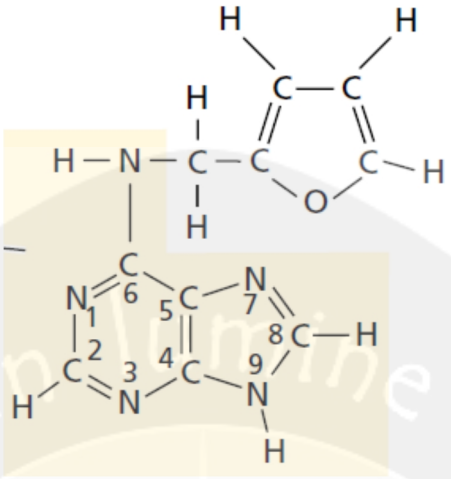


Gambar 5. Struktur kimia 2,4-D (Sumber: Taiz and Zeiger, 2002)

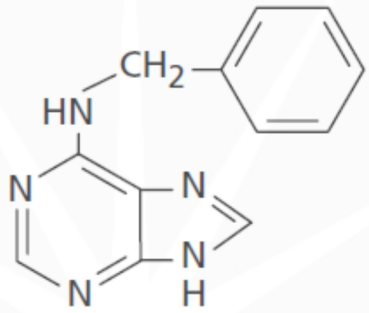


Gambr 6. Struktur kimia IAA (Sumber: Taiz and Zeiger, 2002)

Sitokinin berperan dalam pengontrolan pembelahan sel dan diferensiasi sel (Campbell dkk., 2000). Kinetin merupakan salah satu ZPT golongan sitokinin yang berperan dalam pembelahan sel. Struktur kimia dari kinetin dapat dilihat pada Gambar 7. Benzilaminopurin (BAP) memiliki struktur (Gambar 8) yang mirip dengan kinetin dan juga aktif dalam pertumbuhan dan proliferasi kalus, sehingga BAP merupakan sitokinin yang paling aktif (Noggle and Fritz, 1983). Menurut George dan Sherington (1984) BAP merupakan salah satu sitokinin sintetik yang aktif dan daya rangsangnya lebih lama karena tidak mudah dirombak oleh enzim dalam tanaman.



Gambar 7. Struktur kimia kinetin (Sumber: Taiz and Zeiger, 2002)



Gambar 8. Struktur kimia BAP (Sumber: Taiz and Zeiger, 2002)

Jika sitokinin ditambahkan bersama-sama dengan auksin, sel-sel akan membelah. Rasio sitokinin terhadap auksin mengontrol diferensiasi sel. Ketika konsentrasi kedua hormon itu hampir sama, massa sel akan terus bertambah, tetapi tetap sebagai kalus yang tidak terdiferensiasi (Campbell dkk., 2000).

Penelitan Verma *et al*. (2012) melakukan induksi kalus *Catharanthus roseus* pada medium MS dengan variasi konsentrasi auksin, sitokinin, dan auksin-sitokinin. Hasil penelitian tersebut menyebutkan bahwa kombinasi auksin-sitokinin didapati dapat meningkatkan pertumbuhan kalus daun dan kandung alkaloid. Konsentrasi auksin rendah dan kandungan sitokinin tinggi memberi efek lebih baik untuk proliferasi dan pertumbuhan

kalus, serta peningkatan kandungan alkaloid pada kalus daun *Catharanthus roseus*.

H. Ekstraksi dan Analisis Kandungan Capsaicin

Ekstraksi adalah proses penarikan kandungan kimia yang dapat larut sehingga dipisahkan dari bahan yang tidak larut dengan penyaring (Voigt, 1994). Ragam ekstraksi yang tepat bergantung pada tekstur dan kandungan air bahan tumbuhan yang diekstraksi dan pada jenis senyawa yang diisolasi. Umumnya perlu 'membunuh' jaringan tumbuhan untuk mencegah terjadinya oksidasi enzim atau hidrolisis. Prinsip ekstraksi adalah melarutkan senyawa polar dalam pelarut polar dan senyawa nonpolar dalam senyawa nonpolar (Harborne, 2006). Metode ekstraksi yang digunakan salah satunya adalah maserasi. Maserasi merupakan proses pengekstrakan simplisia menggunakan pelarut dengan yang dikocok atau diaduk pada temperatur ruangan (kamar) (Departemen Kesehatan RI, 2000).

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) merupakan metode pemisahan fisikokimia yang berdasarkan atas penyerapan, partisi (pembagian) atau gabungannya. KLT sendiri banyak digunakan baik untuk tujuan kualitatif, kuantitatif, maupun preparatif/analitik (Fried and Sherma, 1999). Teknik KLT sangat bermanfaat untuk analisis obat dan bahan lain dalam laboratorium karena hanya memerlukan peralatan sederhana, waktu yang cukup singkat (15-60 menit), dan jumlah zat yang diperiksa cukup kecil, yaitu kira-kira 0,01 g senyawa murni ataupun 0,1 g simplisia. KLT adalah salah satu subdivisi kromatografi cair di mana fase gerak berupa cairan dan fase

stasioner berupa lapisan tipis pada permukaan pelat yang datar (Fried and Sherma, 1999).

Fase stasioner adalah lapisan tipis penyerapan yang seragam atau media terpilih yang digunakan sebagai media pembawa. Penyerap dilekatkan pada penyangga sebagai pelapis untuk mendapatkan lapisan yang stabil dengan ukuran yang sesuai. Penyangga yang sering digunakan adalah lempeng gelas juga lembaran plastik dan alumunium, sedangkan penyerap yang paling sering digunakan antara lain silika gel, alumina, kieselguhr, dan selulosa (Touchstone and Dobbins, 1983).

Fase gerak adalah medium transport untuk memisahkan zat terlarut (*solute*) berdasarkan pergerakan atau migrasi sepanjang fase stasioner melalui gaya kapiler (Fried and Sherma, 1999). Sifat dan komposisi kimia fase gerak ditentukan oleh jenis zat yang akan dipisahkan dan jenis penyerap yang digunakan untuk pemisahan. Komposisi fase gerak dapat berupa pelarut murni maupun campuran kompleks dari beberapa pelarut (Touchstone and Dobbins, 1983).

Pipa kapiler dapat digunakan sebagai alat penotolan cuplikan. Bentuk totolan cuplikan dapat berupa titik atau pita dengan diameter totolan antara 2 mm hingga 5 mm dan volume cairan yang ditotolkan dapat berkisar antara 1 hingga 2 µl atau lebih untuk mencegah terdifusinya cairan totolan tersebut. Agar diameter penotolannya tidak terlalu besar, tetes demi tetes larutan cuplikan ditotolkan setelah pelarut tetesan sebelumnya menguap. Penguapan dapat dipercepat menggunakan udara panas atau aliran nitrogen (Stahl, 1969).

Deteksi noda KLT terkadang lebih mudah dibandingkan kromatografi kertas karena dapat digunakan teknik-teknik umum yang lebih banyak digunakan. Noda yang tidak berwarna atau tidak berpendar jika dikenai sinar ultra violet dapat ditampakkan dengan cara mendedahkan papan pengembang pada uap iod. Pada tahap identifikasi atau penampakan noda, jika noda sudah berwarna dapat langsung diperiksa dan ditentukan harga Rf (*Retention factor*)-nya. Rf adalah derajat retensi suatu komponen dalam fase diam. Rf juga disebut faktor retardasi. Harga Rf dihitung sebagai jarak yang ditempuh oleh komponen dibagi dengan jarak yang ditempuh eluen (fase gerak) (Soebagio dkk., 2005):

$$Rf = \frac{Jarak\ yang\ ditempuh\ komponen}{Jarak\ yang\ ditempuh\ eluen}$$

I. Hipotesis

1. Kadar nutrien 1½ MS menghasilkan kalus dengan kandungan capsaicin optimal.
2. Kombinasi auksin dan sitokinin yang paling optimal bagi induksi kalus dan produksi capsaicin secara kuantitatif adalah 0,04 mg/L IAA dan 2,0 mg/L BAP.