

Biofarmasi

Journal of Natural Products Biochemistry

**VOLUME 2
NOMOR 1
PEBRUARI 2004
ISSN: 1693-2242**

PENERBIT:

Jurusan Biologi FMIPA Universitas Sebelas Maret Surakarta

ALAMAT PENERBIT/REDAKSI:

Jl. Ir. Sutami 36A Surakarta 57126.

Tel. & Fax. +62-271-663375

Tel. +62-271-646994 Psw. 387

Fax. +62-271-646655.

E-mail: biology@mipa.uns.ac.id.

Online: www.biology.uns.ac.id.

TERBIT PERTAMA TAHUN:

2003

ISSN:

1693-2242

PEMIMPIN REDAKSI/PENANGGUNGJAWAB:

S u t a r n o

SEKRETARIS REDAKSI:

Ahmad Dwi Setyawan

Purin Candra Purnama

Elisa Herawati

PENYUNTING PELAKSANA:

Djoko Santoso

Ratna Setyaningsih

Solichatun

Suratman

Surya Dewi Marlina

Tetri Widiyani

Venty Suryanti

PENYUNTING AHLI:

Prof. Dr. Dayar Arbain – Universitas Andalas Padang

Prof. Dr. dr. Santosa, M.S. – Universitas Sebelas Maret Surakarta

Prof. Dr. Syamsul Arifin Achmad – Institut Teknologi Bandung

Dr. Chaerul, Apt. – Pusat Penelitian Biologi LIPI Bogor

Dr. C.J. Sugiharjo, Apt. – Universitas Gadjah Mada Yogyakarta

Dr. Ir. Supriyadi, M.Sc. – Balai Penelitian Tanaman Obat dan Rempah Bogor

Drs. Suranto, M.Sc., Ph.D. – Universitas Sebelas Maret Surakarta

Biofarmasi, Journal of Natural Products Biochemistry

mempublikasikan tulisan ilmiah, baik hasil penelitian asli maupun telaah pustaka (review) dalam lingkup ilmu-ilmu farmasi dan biologi, dengan tema khusus biokimia bahan alam (*natural product biochemistry*). Setiap naskah yang dikirimkan akan ditelaah oleh redaktur pelaksana, redaktur ahli, dan redaktur tamu yang diundang secara khusus sesuai bidangnya. Dalam rangka menyongsong pasar bebas, penulis sangat dianjurkan menuliskan karyanya dalam Bahasa Inggris, meskipun tulisan dalam Bahasa Indonesia yang baik dan benar tetap sangat dihargai. Hingga nomor ini, jurnal dikirimkan kepada institusi-institusi yang meminta tanpa biaya pengganti, sebagai bentuk pertukaran pustaka demi mendorong penelitian, pengembangan, dan pemanfaatan bahan alam. Jurnal ini terbit dua kali setahun, setiap bulan Pebruari dan Agustus.

Pertumbuhan, Kadar Klorofil-Karotenoid, Saponin, Aktivitas Nitrat reduktase Anting-anting (*Acalypha indica* L.) pada Konsentrasi Asam Giberelat (GA₃) yang Berbeda

Growth, content of chlorophyll-carotenoid, saponins, and activity of nitrate reductase of Acalypha (Acalypha indica L.) under teh different concentrations of gibberelic acid (GA₃)

DWI KARSIWI PENI, SOLICHATUN*, ENDANG ANGGARWULAN

Jurusan Biologi FMIPA Universitas Sebelas Maret Surakarta 57126.

* Korespondensi: Jl. Ir. Sutami 36A Surakarta 57126. Tel. & Fax.: +62-271-663375. e-mail: olich@mipa.uns.ac.id.

Diterima: 17 Agustus 2002. Disetujui: 28 Pebruari 2003.

Abstract. The aims of this research were to find out the influence of gibberellic acid supply on growth, content of chlorophyll-carotenoid, saponins, and nitrate reductase activity of acalypha (*Acalypha indica* L.). The framework of this research was that the supply of gibberellic acid will influence cell division and cell enlargement. The effect of gibberellic acid at cell division occurred in the cell cycle by means of shortening G₁ phase of cell cycle. Gibberellic acid will force the cell enlargement by the possibility of increasing cell osmotic pressure and membrane permeability that in turn cause water osmotic, so that the cell enlargement has taken place. The role of gibberellic acid is to support cell elongation, cambium activity and RNA synthesis and also protein synthesis. The method used in this research was completely randomized design with one factor, the treatment of GA₃ supply in five level concentrations, 0 ppm, 25 ppm, 50 ppm, 75 ppm and 100 ppm, each given twice a week for a month. The result of the research indicated that the spray of GA₃ with concentration of 50 ppm could increase the growth, saponin, and nitrate reductase activity of acalypha, while the spray of higher concentration of GA₃ (more than 50 ppm) tend to decrease of those three parameters.

Keywords: gibberellic acid, *Acalypha indica*, the growth, chlorophyll-carotenoid, saponin, nitrate reductase.

PENDAHULUAN

Saat ini terdapat kecenderungan kuat untuk kembali menggunakan barang dan jasa yang bersifat alami (*back to nature*), termasuk penggunaan obat bagi kesehatan (Soemantri, 1993). Hal tersebut sangat dirasakan baik di negara maju maupun negara sedang berkembang. Diperkirakan 80% dari penduduk dunia menggantungkan pengobatannya terutama pada obat tradisional (Pramono, 2002).

Anting-anting (*Acalypha indica* L.) merupakan tumbuhan herba semusim yang banyak tumbuh liar di tepi jalan, lapangan rumput ataupun lereng-lereng gunung. Seluruh bagian dari tumbuhan ini dapat dimanfaatkan sebagai obat tradisional baik dalam sediaan basah maupun kering. Kandungan kimia *A. indica* menurut Hutapea (1993) adalah saponin, tanin, flavonoid dan minyak atsiri. *Acalypha indica* juga mengandung akalifin, akalifus, triasetonamin, resin, quebrasitol, zat samak dan glukosida sianogenik (Raj dan Singh, 2000). Penggunaannya antara lain sebagai pencahar, obat penyakit mata, bronkhitis, tumor, jerawat, kudis, paru-paru dan eksim (Hutapea, 1993). Selain itu *A. indica* dapat juga digunakan untuk mengobati penyakit gula (*diabetes melitus*) (Duryatmo, 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 (Raharjo dkk., 2000). Pengambilan secara langsung dari alam secara berlebihan, diduga merupakan faktor utama yang dapat mengancam kelestariannya. Selain itu, tumbuhan *A. indica* masih belum dibudidayakan, sehingga kadar metabolit sekundernya bervariasi, cenderung rendah dan sulit untuk dapat memperoleh suatu tumbuhan *A. indica* yang mempunyai kadar metabolit sekunder sama. Untuk itu perlu usaha budidaya secara terarah untuk meningkatkan pertumbuhan dan penyediaan bahan *A. indica* yang mempunyai kadar metabolit sekunder tinggi serta tersedia secara kontinyu (Sudarsono dan Mulyono, 1998). Berbagai cara yang umum dilakukan adalah dengan pemilihan bibit unggul, pemupukan dan perlindungan dari serangan hama.

Kadar metabolit sekunder dapat ditingkatkan antara lain dengan penambahan zat pengatur tumbuh. Pengaruh pemberian zat pengatur tumbuh terhadap kadar metabolit sekunder memberikan hasil yang bervariasi diantaranya ditentukan oleh spesies tumbuhan yang dibudidayakan, serta jenis dan konsentrasi zat pengatur tumbuh yang ditambahkan. Aplikasi zat pengatur tumbuh mempunyai peluang yang cukup besar karena dapat memanipulasi metabolit sekunder seperti senyawa

alkaloid, flavonoid, saponin dan tanin yang dikandungnya (Moko dkk., 1993). Salah satu penggunaan zat pengatur tumbuh tersebut, diantaranya adalah asam giberelat (GA_3). Pemberian GA_3 pada tumbuhan akan berpengaruh pada penambahan tinggi tumbuhan, panjang internodia serta ukuran dan tebal daun (Hopkins, 1995). Pada beberapa jenis tanaman sayuran yang berupa herba GA_3 diberikan mulai dari konsentrasi 25 ppm sampai 250 ppm ternyata dapat meningkatkan hasil biomassa lebih dari 20% (Kusumo dalam Widiastuti dkk., 1993).

Pengukuran aktivitas enzim merupakan salah satu upaya untuk mengetahui tingkat metabolisme tumbuhan. Diantaranya adalah enzim nitrat reduktase karena nitrat reduktase merupakan enzim yang penting dalam rantai reduksi unsur nitrat menjadi amonia yang berguna dalam pembentukan asam amino, protein, klorofil dan senyawa-senyawa lain yang mengandung unsur nitrogen. Senyawa-senyawa tersebut sangat penting dalam proses pertumbuhan vegetatif dan generatif suatu tanaman (Lea dan Leegood, 1993).

Penelitian ini bertujuan: (i) mempelajari pengaruh pemberian asam giberelat terhadap pertumbuhan *A. Indica*, (ii) mempelajari pengaruh pemberian asam giberelat terhadap kadar saponin dan aktivitas nitrat reduktase *A. indica*.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan tempat penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan September-Desember 2002 di rumah kaca Sub. Lab Biologi, Laboratorium Pusat FMIPA UNS.

Cara kerja

Rancangan percobaan

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap faktor tunggal yaitu perlakuan pemberian GA_3 . Perlakuan yang diberikan yaitu:

D_0 = Tanpa penyemprotan (kontrol)

D_1 = Penyemprotan GA_3 pada konsentrasi 25 ppm

D_2 = Penyemprotan GA_3 pada konsentrasi 50 ppm

D_3 = Penyemprotan GA_3 pada konsentrasi 75 ppm

D_4 = Penyemprotan GA_3 pada konsentrasi 100 ppm (Widiastuti dkk., 1993). Setiap perlakuan dengan 5 ulangan.

Pelaksanaan penelitian

Pembuatan larutan GA_3 . Larutan GA_3 dengan melarutkan GA_3 dengan berat tertentu dalam 1 ml alkohol 95% kemudian diencerkan dengan akuades sampai 1000 ml.

Persiapan media tanah. Tanah sebanyak 10 g dimasukkan dalam gelas piala 50 ml, ditambahkan 25 ml $CaCl_2$ 0,01M dengan pipet, diaduk dengan batang gelas selama 30 menit dan dibiarkan semalam, kemudian diukur pH-nya dengan memasukkan elektrode ke dalam suspensi tanah. Tanah ditimbang masing-masing 1 kg, kemudian tiap pot plastik dicampur dengan pupuk kompos dengan perbandingan 2:1.

Penanaman. Biji *A. indica* diperoleh dari sekitar kampus UNS, dikeringanginkan di tempat terbuka dan dipilih yang berwarna coklat tua. Biji ditanam pada pot plastik masing-masing pot 5 butir, setelah 2 minggu (daun sebanyak 5-6 helai) dipilih 1 tumbuhan untuk diberi perlakuan. Tumbuhan *A. indica* disiram 2 hari sekali dengan volume penyiraman 240 ml.

Perlakuan. Seluruh bagian tumbuhan *A. indica*, kecuali akar disemprot GA_3 pada jarak 15 cm dengan volume penyemprotan 5 ml (10 kali penyemprotan dengan tekanan yang sama) menggunakan *hand sprayer*, tumbuhan ditutup dengan tudung plastik dan jarak antar tumbuhan 10 cm. Penyemprotan dilakukan tiap 2 kali seminggu (Senin dan Kamis) pada pagi hari sampai akhir perlakuan yaitu selama 1 bulan (Chairani, 1988).

Pengukuran parameter lingkungan seperti kelembaban, intensitas cahaya dan suhu dilakukan dua minggu sekali.

Pengamatan. Parameter yang diamati meliputi:

Tinggi batang diukur setiap seminggu sekali, pengukuran dimulai dari permukaan tanah (tanda tertentu) sampai ujung batang.

Berat kering dengan cara tumbuhan dioven pada suhu 60°C selama 3 hari agar tercapai berat kering konstan kemudian ditimbang (Sitompul dan Guritno, 1995).

Panjang akar dihitung mulai dari leher akar sampai ujung akar.

Jumlah daun yang telah mempunyai lembaran terbuka dihitung tiap seminggu sekali.

Luas daun diukur pada waktu panen yang pada prinsipnya luas daun ditaksir melalui perbandingan berat (gravimetri) yang pertama dilakukan adalah menggambar daun yang akan ditaksir luasnya pada sehelai kertas yang menghasilkan replika (tiruan daun). Replika daun tersebut kemudian digunting dan luas daun ditaksir berdasarkan persamaan:

$$LD = \frac{W_r}{W_t} \times LK$$

Keterangan:

LD = luas daun

W_r = berat kertas replika daun

W_t = berat total kertas

LK = luas total kertas (Sitompul dan Guritno, 1995).

Kadar klorofil total diukur dengan cara: daun keenam yang telah membenteng sempurna diambil 0,1 g. Potongan daun dihancurkan dalam mortar kemudian ditambahkan 10 ml aseton 80%. Larutan didiamkan beberapa saat. Larutan disaring dengan kertas saring Whatman no. 42. Filtrat dimasukkan ke dalam kuvet sebanyak 3 ml kemudian dimasukkan ke dalam spektrofotometer. Larutan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 645 nm dan 663 nm. Kadar klorofil dihitung dengan rumus: Klorofil Total = 8,02 (A.663) + 20,2 (A.645) mg/L (Harborne, 1987).

Kadar saponin pada akar *A. indica* dengan metode spektrofotometer UV-Vis, caranya: akar kering digerus dengan mortar hingga menjadi serbuk. Serbuk yang telah dihaluskan sebanyak 0.1 g diekstraksi dengan 10 ml etanol 70% di atas

penangas air pada suhu 80°C selama 15 menit. Hasil ekstraksi diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada λ 365 nm dengan menggunakan saponin merk sebagai larutan standar (Stahl, 1985). Dari absorbansi yang diperoleh dapat diketahui kadar saponin dalam satuan ppm.

Aktivitas nitrat reduktase diukur dengan cara: akar dicuci dengan akuades sampai bersih, lalu dipotong kecil-kecil kira-kira 1 mm dengan pisau *cutter* yang tajam. Potongan akar sebanyak 500 mg dimasukkan ke dalam tabung film gelap berisi larutan buffer Na-phospat 0,1M sebanyak 5 ml (campuran $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dan $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) dengan perbandingan tertentu. Setelah dilakukan perendaman selama 24 jam diganti dengan larutan buffer baru dan ditambahkan 0,1 ml NaNO_3 5M sebagai substrat dengan pipet dan dicatat waktunya sebagai awal inkubasi. Disiapkan reagen pewarna yang terdiri dari 0,2 ml 0.02% larutan N-Naphthylethylene diamine dan 0,2 ml 1% sulfanilamide dalam HCl 3N. Setelah inkubasi 1 jam diambil 0,1 ml cairan inkubasi dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi reagen pewarna. Kemudian ditunggu 1 menit sampai terjadi warna merah muda sebagai tanda telah terjadi reduksi nitrat menjadi nitrit oleh enzim nitrat reduktase. Satu tabung reaksi tidak diberi filtrat dan digunakan sebagai blanko. Pada tabung yang telah ditambahkan ke kuvet diukur absorbansinya dalam spektrofotometer pada λ 540 nm. Aktivitas nitrat reduktase dinyatakan dalam mikromol nitrat/gr jaringan bahan tiap jam dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{ARN} = \frac{\text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi standart}} \times 50 \times \frac{1000}{\text{BB}} \times \frac{1}{W_1} \times \frac{1}{1000}$$

Keterangan:

Absorbansi standar: 0,0142;

BB : Berat basah (mg)

W_1 : Waktu inkubasi (jam) (Hartiko *cit* Listyawati, 1994)

Analisis data

Data yang diperoleh diuji dengan analisis sidik ragam (ANOVA) untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap parameter yang diukur. Untuk mengetahui beda nyata diantara perlakuan digunakan uji *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT) pada taraf uji 5%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pertumbuhan *A. indica*

Tinggi batang

Tinggi batang merupakan ukuran tumbuhan yang sering diamati baik sebagai indikator pertumbuhan maupun sebagai parameter yang digunakan untuk mengukur pengaruh lingkungan atau perlakuan yang diterapkan. Tinggi batang merupakan indikator pertumbuhan yang paling mudah diukur dan dianjurkan pada tumbuhan

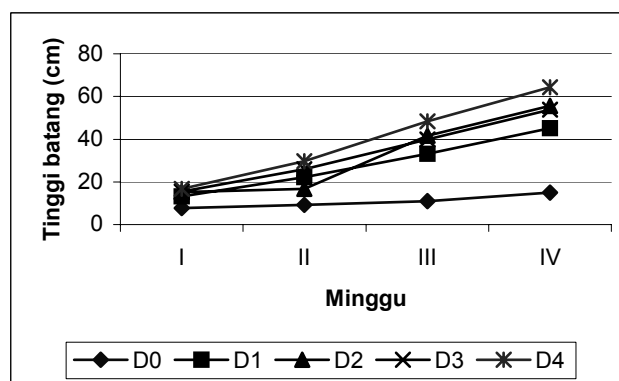
berbatang tunggal dengan percabangan lateral yang terbatas (Sitompul dan Guritno, 1995).

Hasil analisis sidik ragam tinggi *Acalypha indica* menunjukkan bahwa pemberian asam giberelat memberikan pengaruh nyata terhadap tinggi batang. Pengaruh antar perlakuan dapat dilihat pada Tabel 1. Dari uji DMRT 5% diketahui bahwa antara kontrol, perlakuan konsentrasi 25 ppm dan perlakuan konsentrasi 100 ppm menunjukkan adanya beda nyata. Namun pada perlakuan konsentrasi 50 ppm tidak menunjukkan beda nyata dengan perlakuan konsentrasi 75 ppm.

Tabel 1. Rata-rata tinggi batang (cm), berat kering (g), dan panjang akar (cm) *A. indica* setelah 1 bulan dengan perlakuan asam giberelat pada berbagai konsentrasi.

Konsentrasi GA_3 (ppm)	D ₀	D ₁	D ₂	D ₃	D ₄
Tinggi batang (cm)	14,90 ^a	45,20 ^b	55,50 ^c	53,75 ^c	64,35 ^d
Berat kering (g)	1,02 ^a	1,26 ^{ab}	1,74 ^c	1,39 ^b	1,52 ^{bc}
Panjang akar (cm)	17,00 ^{bc}	16,15 ^{ab}	18,65 ^c	17,85 ^{bc}	14,65 ^a

Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang sama dalam satu baris menunjukkan tidak ada beda nyata dalam DMRT 5%. D: Konsentrasi GA_3 ; D₀: 0 ppm, D₁: 25 ppm, D₂: 50 ppm, D₃: 75 ppm, D₄: 100 ppm



Gambar 1. Tinggi batang (cm) *A. indica* setelah 1 bulan perlakuan asam giberelat pada berbagai konsentrasi. Keterangan: D: Konsentrasi GA_3 ; D₀: 0 ppm, D₁: 25 ppm, D₂: 50 ppm, D₃: 75 ppm, D₄: 100 ppm.

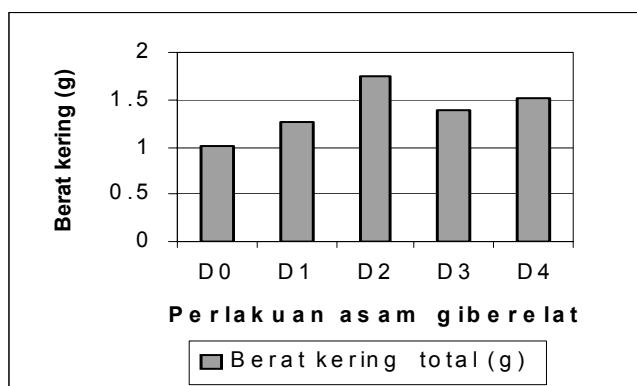
Peningkatan tinggi batang mulai terlihat pada minggu pertama setelah perlakuan (Gambar 1.). Kenaikan dimulai dari konsentrasi 25 ppm dan 50 ppm, cenderung menurun pada konsentrasi 75 ppm kemudian naik lagi pada konsentrasi 100 ppm. Dari data yang diperoleh diketahui bahwa pemberian asam giberelat pada konsentrasi 100 ppm menyebabkan peningkatan tinggi batang yang paling besar dibandingkan perlakuan-perlakuan yang lain. Peningkatan tinggi batang dengan pemberian asam giberelat ini sesuai dengan pendapat bahwa asam giberelat mempunyai peranan dalam mendukung pembelahan sel, pembentangan sel, aktivitas kambium dan pembentukan RNA baru serta sintesis protein (Taiz dan Zeiger, 1998).

Berat Kering

Menurut Lakitan (1996) berat kering tumbuhan menggambarkan akumulasi senyawa organik yang berhasil disintesis tumbuhan dari senyawa-senyawa anorganik terutama air dan CO₂. Pertambahan berat kering tumbuhan berasal dari unsur hara yang telah terserap oleh akar. Unsur hara ini digunakan dalam proses sintesis senyawa organik.

Berat kering tumbuhan merupakan parameter yang sering digunakan untuk menggambarkan dan mempelajari pertumbuhan tumbuhan karena mudah diukur dan merupakan integrasi dari hampir semua peristiwa yang dialami tumbuhan. Pengeringan dimaksudkan untuk menghilangkan semua kandungan air bahan dan menghentikan aktivitas metabolisme (Sitompul dan Guritno, 1995).

Hasil analisis sidik ragam berat kering tumbuhan *A. indica* menunjukkan bahwa pemberian asam giberelat berpengaruh nyata terhadap berat kering tumbuhan *A. indica*. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan Chairani (1988) bahwa pemberian asam giberelat pada tanaman pepewmin (*Mentha piperita* L.) dapat meningkatkan berat kering tanaman. Hasil uji DMRT 5% (Tabel 1.) menunjukkan bahwa antara kontrol dan konsentrasi 50 ppm menunjukkan adanya beda nyata. Namun pada konsentrasi 25 ppm tidak menunjukkan beda nyata dengan konsentrasi 75 ppm. Dari Gambar 2. dapat diketahui bahwa konsentrasi optimum dicapai pada konsentrasi 50 ppm dan perlakuan di atas konsentrasi tersebut menunjukkan penurunan berat kering.



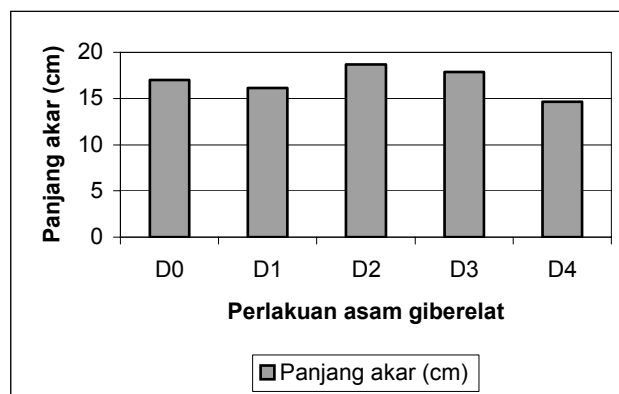
Gambar 2. Berat kering (g) *A. indica* setelah 1 bulan perlakuan asam giberelat pada berbagai konsentrasi. Keterangan: D: Konsentrasi GA₃; D0: 0 ppm, D₁: 25 ppm, D₂: 50 ppm, D₃: 75 ppm, D₄: 100 ppm.

Panjang akar

Dalam proses pertumbuhan, akar memegang peranan yang sangat penting. Disamping berfungsi sebagai organ tumbuhan yang menopang agar tumbuhan dapat berdiri tegak, sehingga dapat melaksanakan aktivitas fisiologi yang baik, akar merupakan organ utama tumbuhan yang berperan dalam absorpsi hara dan air. Akar tumbuhan juga aktif melakukan sejumlah metabolisme, terutama

respirasi dan sintesis berbagai persenyawaan organik.

Hasil analisis sidik ragam panjang akar menunjukkan bahwa pemberian asam giberelat berpengaruh nyata terhadap panjang akar *A. indica*. Dari hasil uji DMRT 5% (Tabel 1.) diketahui bahwa antara konsentrasi 50 ppm dan 100 ppm menunjukkan adanya beda nyata. Pemberian asam giberelat pada konsentrasi di atas 50 ppm menunjukkan adanya penurunan (Gambar 3.). Pertumbuhan akar lebih dikendalikan secara genetik dan hormonal daripada dikendalikan oleh mekanisme lingkungan. Walaupun morfologi akar dikendalikan secara genetik, tetapi lingkungan tanah mempengaruhi juga, seperti adanya hambatan mekanis tanah, suhu tanah, aerasi tanah, kelembaban tanah, keasaman tanah (pH) yang pada penelitian ini digunakan media tanah dengan pH 6-7, ketersediaan air serta garam mineral (Salisbury dan Ross, 1995).

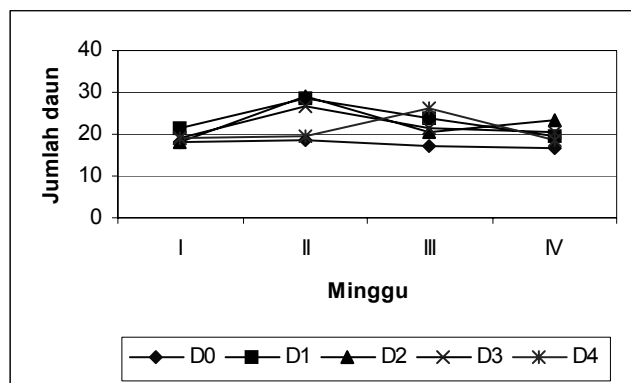


Gambar 3. Panjang akar (cm) *A. indica* setelah 1 bulan perlakuan asam giberelat pada berbagai konsentrasi. Keterangan: D: Konsentrasi GA₃; D0: 0 ppm, D₁: 25 ppm, D₂: 50 ppm, D₃: 75 ppm, D₄: 100 ppm.

Jumlah daun

Jumlah dan ukuran daun dipengaruhi oleh faktor genetik (genotip) dan lingkungan. Pertumbuhan vegetatif, diantaranya pertumbuhan jumlah daun dipengaruhi oleh besarnya hasil fotosintesis (Sitompul dan Guritno, 1995). Jumlah daun akan bertambah pada masa pertumbuhan aktif. Jumlah daun yang lebih banyak memungkinkan terjadinya fotosintesis yang lebih cepat, sehingga menghasilkan fotosintat yang lebih banyak. Fotosintat akan diangkut dari daun ke bagian-bagian lain untuk pertumbuhannya (Khoiriyah, 1999).

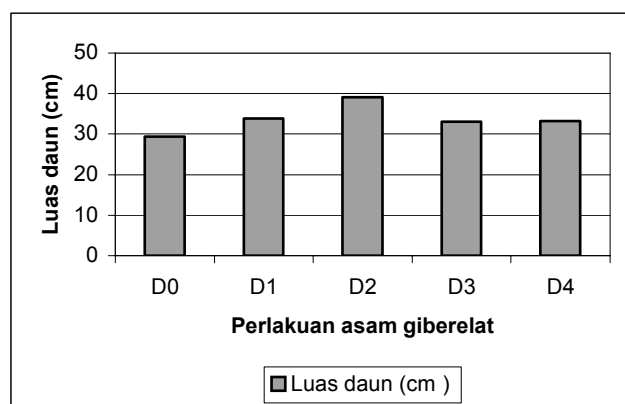
Hasil analisis sidik ragam jumlah daun *A. indica* menunjukkan bahwa pemberian asam giberelat tidak memberikan pengaruh nyata terhadap jumlah daun *A. indica*. Dari Gambar 4. diketahui bahwa pada minggu pertama setelah perlakuan asam giberelat terjadi peningkatan jumlah daun, peningkatan mulai terjadi dari konsentrasi 25 ppm dan 50 ppm, kemudian menurun pada konsentrasi di atas 50 ppm.



Gambar 4. Jumlah daun *A. indica* dengan perlakuan asam giberelat per minggu. Keterangan: D: Konsentrasi GA_3 ; D0: 0 ppm, D1: 25 ppm, D2: 50 ppm, D3: 75 ppm, D4: 100 ppm

Luas daun

Secara umum, daun dipandang sebagai organ produsen fotosintesis utama sekalipun proses fotosintesis dapat berlangsung pada bagian lain dari tumbuhan dengan sumbangan yang berarti pada saat tertentu. Oleh karena itu, pengamatan daun sangat diperlukan selain sebagai indikator pertumbuhan juga sebagai data penunjang untuk menjelaskan proses pertumbuhan yang terjadi seperti pada pembentukan biomassa tumbuhan. Helaian daun merupakan bagian utama yang mengandung jaringan fotosintesis sedangkan tangkai daun yang berfungsi menopang helaian daun memiliki hanya relatif kecil jaringan fotosintesis. Luas daun tumbuhan digunakan sebagai parameter pertumbuhan karena fungsinya sebagai penerima cahaya dan alat fotosintesis (Sitompul dan Guritno, 1995). Hasil analisis sidik ragam luas daun menunjukkan bahwa pemberian asam giberelat tidak memberikan pengaruh nyata terhadap luas daun *A. indica*. Dari Gambar 5. diketahui bahwa pada konsentrasi 50 ppm terjadi peningkatan luas daun.



Gambar 5. Luas daun (cm^2) *A. indica* setelah 1 bulan perlakuan asam giberelat pada berbagai konsentrasi. Keterangan: D: Konsentrasi GA_3 ; D0: 0 ppm, D1: 25 ppm, D2: 50 ppm, D3: 75 ppm, D4: 100 ppm.

Kadar klorofil total *A. indica*

Dari hasil analisis sidik ragam diketahui bahwa pemberian asam giberelat tidak memberikan pengaruh yang nyata terhadap kadar klorofil total. Selain itu, diketahui juga bahwa kadar klorofil total daun *A. indica* setelah 1 bulan perlakuan asam giberelat lebih rendah dibandingkan kontrol, hal ini kemungkinan disebabkan saat analisis dilakukan, tumbuhan mengalami fase reproduktif (berbunga) karena tenaga yang dihasilkan dari proses respirasi, pada saat setelah berbunga sudah tidak berpusat untuk pembentukan klorofil, tetapi sudah mulai digunakan untuk perkembangan biji, sehingga kadar klorofil menurun (Salisbury dan Ross, 1995).

Data parameter lingkungan menunjukkan bahwa suhu rumah kaca sekitar 34^0-40^0C , sehingga mempengaruhi pembentukan klorofil *A. indica*. Suhu dapat mempengaruhi kerja enzim dalam biosintesis klorofil, pada suhu yang tinggi kerja enzim akan terganggu, sehingga pembentukan klorofil akan terhambat. Selain itu, pembentukan klorofil juga banyak dipengaruhi oleh faktor genetik; cahaya; kandungan O_2 , N, Mg, Fe, Mn, Cu, dan Zn; karbohidrat dan air (Dwidjoseputro, 1994).

Pembentukan klorofil terhambat mengakibatkan aktivitas fotosintesis menurun dan metabolisme primer juga tertekan. Pembentukan klorofil melibatkan siklus asam sitrat dan asam amino. Gabungan antara asam sitrat dan asam amino tersebut akan menghasilkan asam amino levulinat sebagai senyawa antara pembentukan klorofil. Jika asam amino yang merupakan prekursor pembentukan klorofil menurun maka akan terjadi reduksi pembentukan klorofil. Berkurangnya asam amino tersebut mungkin karena adanya pengurangan oleh suatu zat tertentu, misalnya enzim (Lakitan, 1996). Peranan asam giberelat dalam pembentukan klorofil adalah pada pengaktifan enzim, setelah asam giberelat mengikat enzim yang terdapat pada membran, maka enzim tersebut akan mengubah ATP menjadi AMP-siklik, yang selanjutnya menggerakkan berbagai rentetan reaksi-reaksi sekunder dan tersier termasuk pembentukan klorofil-karotenoid. Dalam sistem ini, AMP-siklik disebut pembawa/kurir berita kedua, sedangkan asam giberelat disebut pembawa/kurir berita pertama (Wattimena, 1988).

Pengaruh asam giberelat pada pertumbuhan *A. indica*

Pada penelitian ini, tanah yang digunakan untuk media tanam baik sebelum maupun sesudah perlakuan berada pada batas normal antara 6-7, sehingga baik untuk pertumbuhan dan pertumbuhan akan menurun pada pH 9,0. Demikian juga kandungan N tanah yang masih berada pada batas normal antara 0,2-0,4% (Islami dan Hadi, 1995).

Peningkatan tinggi batang, jumlah dan luas daun serta panjang akar mengakibatkan terjadinya peningkatan berat kering. Jumlah daun yang lebih banyak memungkinkan terjadinya fotosintesis yang lebih cepat, sehingga menghasilkan fotosintat yang lebih banyak (Khoiriyah, 1999). Namun analisis kadar klorofil menunjukkan adanya penurunan dibandingkan kontrol. Hal ini dimungkinkan karena daun mengalami stress akibat pemberian asam

giberelat yang tinggi, sehingga daun berwarna hijau muda sedikit pucat. Hal ini disebabkan karena asam giberelat yang diberikan terlalu tinggi konsentrasinya, sehingga plasma membran tidak mampu meneruskan respon dari asam giberelat dan terjadi peristiwa osmosis, sehingga air yang ada di dalam sel akan ikut keluar dari sel. Secara umum hormon dibutuhkan tanaman dalam jumlah yang kecil (10^{-6} - 10^{-5} nM) (Wattimena, 1988).

Mekanisme asam giberelat dalam mempengaruhi pertumbuhan *A. indica* adalah asam giberelat akan mendorong pembelahan sel, karena asam giberelat mempengaruhi siklus sel dengan cara memperpendek fase G_1 dan fase S dari siklus sel. Pada fase S sel akan mengalami replikasi, transkripsi dan sintesis, sehingga terjadi peningkatan jumlah sel dan terjadi pertumbuhan lebih cepat (Lui dan Loy dalam Salisbury dan Ross (1995)).

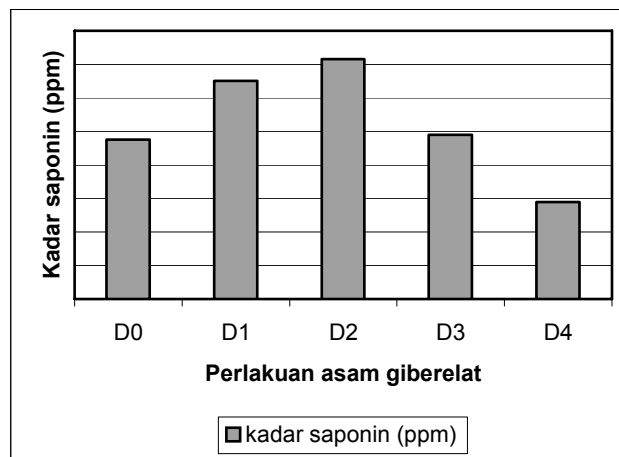
Asam giberelat mendukung pembentukan enzim proteolitik yang membebaskan triptofan sebagai asal bentuk dari auksin. Hal ini berarti bahwa asam giberelat tersebut akan meningkatkan kandungan auksin. Auksin mempunyai peranan dalam pemanjangan sel yaitu dengan mengaktifkan pompa ion pada plasma membran dan mengaktifkan enzim-enzim yang berperan dalam pembuatan komponen sel (Wattimena, 1988).

Mekanisme lain menerangkan bahwa asam giberelat akan menstimulasi pemanjangan sel melalui hidrolisis pati yang dihasilkan dari asam giberelat dan mendukung terbentuknya α amilase yang menyebabkan konsentrasi gula meningkat, hal ini mengakibatkan tekanan osmotik di dalam sel tersebut berkembang. Dengan meningkatnya tekanan osmotik di dalam sel, maka air masuk lebih cepat, sehingga terjadi pembesaran sel dan proses pertumbuhan dapat berlangsung dengan cepat termasuk peningkatan tinggi batang, berat kering, panjang akar, jumlah dan luas daun (Weaver dalam Abidin, 1990). Peningkatan pertumbuhan *A. indica* mencapai optimal pada perlakuan konsentrasi 50 ppm, perlakuan di atas konsentrasi tersebut menunjukkan penurunan pertumbuhan.

Penurunan pertumbuhan pada konsentrasi di atas 50 ppm disebabkan karena adanya pengaturan umpan balik (*feedback control*). Pemberian asam giberelat yang tinggi akan menyebabkan terjadinya penurunan transkripsi GA_{20} oksidase. Giberelin₂₀ oksidase merupakan target utama dalam pengaturan umpan balik. Apabila transkripsi GA_{20} oksidase menurun maka akan terjadi pengeblokan biosintesis asam giberelat. Pengeblokan biosintesis asam giberelat akan menyebabkan aktivitas asam giberelat menjadi menurun (Taiz dan Zeiger, 1998).

Pengaruh asam giberelat terhadap kadar saponin *A. indica*

Hasil analisis sidik ragam menunjukkan bahwa pemberian asam giberelat tidak memberikan pengaruh yang nyata terhadap kadar saponin. Hal ini terlihat pada Gambar 6. dimana pada konsentrasi 50 ppm menunjukkan kadar saponin tertinggi, dan pada pemberian asam giberelat di atas 50 ppm akan mengalami penurunan.



Gambar 6. Kadar saponin (ppm) *A. indica* setelah 1 bulan perlakuan asam giberelat pada berbagai konsentrasi. Keterangan: D: Konsentrasi GA_3 ; D0: 0 ppm, D1: 25 ppm, D2: 50 ppm, D3: 75 ppm, D4: 100 ppm

Pemberian asam giberelat akan mempengaruhi kecepatan pergerakan sitoplasma dan perubahan tekanan turgor sel. Asam giberelat akan mengikat molekul protein atau glikoprotein dari plasma membran, sehingga akan mempengaruhi permeabilitas membran maupun ion-ion organik. Hal ini juga mengakibatkan perubahan atom-atom molekul organik akan keluar atau masuk sel dan merubah tekanan osmotik sel dan selanjutnya menyebabkan perubahan reaksi biokimia sel dan rentetan reaksi sekunder lainnya termasuk biosintesis saponin (Wattimena, 1988).

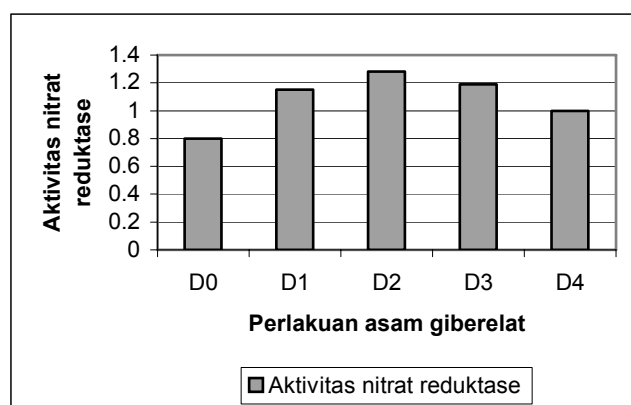
Biosintesis saponin dalam tubuh tumbuhan tergantung dari sifat genotip, umur dan kondisi lingkungan tumbuh (Oleszek *et al.*, 1999). Penurunan kadar saponin dengan pemberian asam giberelat di atas 50 ppm kemungkinan disebabkan adanya mekanisme kejenuhan (Salisbury dan Ross, 1995). Pada saat asam giberelat diberikan maka kadar saponin meningkat hingga mencapai titik jenuh, kemudian ketika konsentrasi asam giberelat terus meningkat, maka kadar saponin mulai menurun karena pada konsentrasi yang tinggi, asam giberelat menjadi bersifat menghambat biosintesis saponin. Mekanisme penghambatan asam giberelat terjadi karena adanya pengaturan umpan balik (*feedback control*) (Taiz dan Zeiger, 1998) seperti dikemukakan pada pembahasan pertumbuhan.

Pengaruh asam giberelat terhadap aktivitas nitrat reduktase *A. indica*

Nitrogen merupakan salah satu unsur esensial yang diperlukan oleh tumbuhan untuk menyusun asam-asam amino, enzim, klorofil, vitamin, asam nukleat. Ion nitrat yang diserap tumbuhan akan diubah menjadi nitrit oleh nitrat reduktase sebagai katalisator selanjutnya nitrit akan diubah pula menjadi amonia, kemudian akan bergabung dengan kerangka karbon hasil antara respirasi untuk pembentukan asam-asam amino yang merupakan bahan dasar pembentuk protein. Pada tumbuhan

hijau asimilasi nitrat sangat erat hubungannya dengan fotosintesis, bukan hanya dalam pembentukan ion nitrat menjadi nitrit tetapi juga dalam pembentukan ion amonia menjadi asam amino. Jadi aktivitas nitrat reduktase menentukan terjadinya asam amino (Noggle dan Fritz, 1983).

Hasil analisis sidik ragam aktivitas nitrat reduktase menunjukkan bahwa pemberian asam giberelat tidak memberikan pengaruh yang nyata. Dari Gambar 7. diketahui bahwa konsentrasi optimum untuk meningkatkan aktivitas nitrat reduktase adalah pada konsentrasi 50 ppm, yang kemudian mulai menurun pada konsentrasi 75 ppm.



Gambar 7. Grafik aktivitas nitrat reduktase ($\mu\text{mol NO}_2^-/\text{g/jam}$) *A. indica* setelah 1 bulan perlakuan asam giberelat pada berbagai konsentrasi. Keterangan: D: Konsentrasi GA_3 ; D0: 0 ppm, D1: 25 ppm, D2: 50 ppm, D3: 75 ppm, D4: 100 ppm.

Aktivitas nitrat reduktase dan pertumbuhan sangat dipengaruhi oleh ketersediaan air dan nutrisi di dalam tanah (Armendaris dkk., 1991). Bidwell (1979) menyebutkan bahwa hormon asam giberelat akan memacu aktivitas nitrat reduktase karena hormon tersebut memacu pembentukan protein. Namun kenyataannya aktivitas nitrat reduktase menunjukkan kecenderungan menurun setelah perlakuan asam giberelat di atas 50 ppm. Hal ini kemungkinan disebabkan adanya mekanisme kejenuhan (Salisbury dan Ross, 1995). Pada saat asam giberelat diberikan maka aktivitas nitrat reduktase meningkat hingga mencapai titik jenuh, kemudian ketika konsentrasi asam giberelat terus meningkat, maka aktivitas nitrat reduktase mulai menurun karena pada konsentrasi yang tinggi, asam giberelat menjadi bersifat menghambat aktivitas nitrat reduktase. Mekanisme penghambatan asam giberelat terjadi karena adanya pengaturan umpan balik (*feedback control*) (Taiz dan Zeiger, 1998) seperti dikemukakan pada pembahasan pertumbuhan dan kadar saponin.

Pengukuran aktivitas nitrat reduktase dilakukan pada saat tumbuhan mengalami fase reproduktif, saat kemampuan tumbuhan mengakumulasi nitrat berkurang dengan cepat. Selama fase ini terjadi ketuaan akar dan menurunnya kemampuan akar menyerap nitrat. Hal ini sesuai dengan Hagemen dalam Widyastuti (1991) yang menyatakan bahwa

aktivitas nitrat reduktase juga dipengaruhi oleh kondisi fisiologi yaitu umur tanaman. Pada saat tanaman masih muda aktivitas nitrat reduktase akan naik dan mencapai maksimal, selanjutnya akan menurun selama penuaan. Adanya inhibitor yang mengganggu reaksi fotosintesis dan respirasi, seperti intensitas cahaya yang tinggi akan menurunkan aktivitas nitrat reduktase, karena energi pereduksi yang dibutuhkan enzim terganggu pembentukannya (Bidwell, 1979).

Hubungan klorofil dan aktivitas nitrat reduktase pada penelitian ini terlihat pada metabolisme nitrogen dan jalur GS-GOGAT. Dimana metabolisme nitrogen diketahui mempunyai hubungan yang erat dengan fotosintesis. Reaksi cahaya dari fotosintesis menyediakan energi untuk mereduksi nitrat menjadi amonium yang salah satu tahapnya direduksi oleh enzim nitrat reduktase. Dalam proses fotosintesis tumbuhan terdapat suatu pigmen yang memegang peranan penting. Pigmen tersebut adalah klorofil. Fungsi klorofil dalam fotosintesis adalah sebagai penangkap cahaya matahari. Menurut Bidwell (1979) energi dan tenaga pereduksi untuk reduksi nitrat berasal dari metabolisme seluler yaitu respirasi karbohidrat. Padahal fotosintesis sendiri meningkatkan pasokan karbohidrat dan NADH yang diperlukan untuk reduksi nitrat dihasilkan dari respirasi karbohidrat. Oleh karena itu kadar klorofil mempunyai hubungan erat dengan aktivitas nitrat reduktase.

Pengaruh asam giberelat terhadap pertumbuhan, kadar saponin dan aktivitas nitrat reduktase A. indica

Pemberian asam giberelat eksogen akan mengubah kecepatan pergerakan protoplasma dan tekanan turgor sel. Asam giberelat akan mengikat molekul protein atau glikoprotein dari plasma membran, sehingga bentuk protein akan berubah selanjutnya merubah sifat-sifat permeabilitas membran air, ion-ion organik, atau molekul-molekul organik keluar atau memasuki sel dan merubah tekanan osmotik sel. Perubahan tekanan osmotik sel juga mempengaruhi proses-proses biokimia sel dan rentetan reaksi-reaksi sekunder yang akhirnya menghasilkan respon tumbuh yang dapat dilihat seperti: peningkatan tinggi batang, berat kering, panjang akar, jumlah dan luas daun serta kadar klorofil *A. indica*.

Pemberian asam giberelat akan menyebabkan pertambahan volume, bobot sel, banyaknya protoplasma, sehingga sel akan menjadi lebih besar dan banyak. Apabila selnya lebih besar dan banyak, maka akan terjadi peningkatan fotosintesis yang selanjutnya menghasilkan fotosintat yang banyak. Dari proses fotosintesis tersebut akan dihasilkan senyawa karbohidrat. Karbohidrat akan digunakan untuk proses respirasi menjadi asam piruvat, kemudian asam piruvat akan diubah menjadi asetil koenzim A yang selanjutnya masuk jalur mevalonat untuk pembentukan senyawa organik seperti klorofil, giberelin dan saponin. Dari proses respirasi tersebut akan dihasilkan juga energi NADH/NADPH yang berguna untuk reduksi unsur nitrat menjadi amonia dengan bantuan enzim nitrat reduktase.

Aktivitas nitrat reduktase akan meningkat dengan adanya penambahan hormon giberelin dari luar (Bidwell, 1979).

Peningkatan aktivitas nitrat reduktase menyebabkan terjadinya peningkatan sintesis protein, produksi klorofil, asam nukleotida, asam amino dan unsur-unsur lain yang dibutuhkan tumbuhan untuk perkembangan vegetatif dan generatif melalui jalur GS-GOGAT. Pemberian asam giberelat dari luar diharapkan dapat meningkatkan kadar saponin *A. indica*. Asam giberelat endogen digunakan untuk pertumbuhan *A. indica*, sedangkan asam giberelat eksogen akan diarah ke biosintesis saponin. Penggunaan asam giberelat pada konsentrasi 100 ppm dapat meningkatkan tinggi batang, konsentrasi 50 ppm meningkatkan berat kering dan panjang akar, kadar saponin dan aktivitas nitrat reduktase. Penggunaan asam giberelat di atas 50 ppm dapat menyebabkan penurunan pertumbuhan, kadar saponin dan aktivitas nitrat reduktase *A. indica*, hal ini disebabkan terjadinya mekanisme umpan balik (*feedback control*). Pemberian asam giberelat yang tinggi akan menyebabkan terjadinya penurunan transkripsi GA₂₀ oksidase. Giberelin₂₀ oksidase merupakan target utama dalam pengaturan umpan balik. Apabila transkripsi GA₂₀ oksidase menurun maka akan terjadi pengeblokan biosintesis asam giberelat. Pengeblokan biosintesis asam giberelat akan menyebabkan aktivitas asam giberelat menjadi menurun (Taiz dan Zeiger, 1998).

KESIMPULAN

Pemberian asam giberelat memberikan pengaruh yang nyata terhadap tinggi batang, berat kering dan panjang akar *Acalypha indica*, sedangkan untuk parameter jumlah daun, luas daun dan kadar klorofil total tidak memberikan pengaruh yang nyata. Konsentrasi asam giberelat untuk meningkatkan tinggi batang dicapai pada perlakuan 100 ppm, untuk berat kering dan panjang akar dicapai pada perlakuan 50 ppm.

Pemberian asam giberelat tidak memberikan pengaruh yang nyata terhadap kadar saponin dan aktivitas nitrat reduktase *A. indica*. Namun demikian pemberian asam giberelat sampai pada konsentrasi 50 ppm dapat meningkatkan kadar saponin dan aktivitas nitrat reduktase, di atas 50 ppm cenderung mengakibatkan penurunan.

DAFTAR PUSTAKA

- Abidin, Z. 1990. *Dasar-dasar Pengetahuan tentang Zat Pengatur Tumbuhan*. Bandung: Penerbit Angkasa.
- Armendaris, A, S.D Woejono, H. Hartiko. 1991. Aktivitas enzim nitrat reduktase dan korelasinya terhadap sifat pertumbuhan tanaman kakao (*Theobroma cacao* L.). *Ilmu Pertanian Fakultas Pertanian UGM* 4 (6): 299-305.
- Bidwell, R.G.1979. *Plant Physiology*. 2nd edition. New York: Macmillan Publishing.
- Chairani, F. 1988. Pengaruh aplikasi fitohormon asam giberelat terhadap biomassa tajuk dan koefisien partisi fotosintat tanaman pepmerin (*Mentha pipeta* L.). *Pusat Penelitian dan Pengembangan Tanaman Indonesia Deptan*. 14 (1-2): 18-24.
- Duryatmo, S. 2000. Anting-anting lawan tanding sakit gula. *Trubus* 31 (373): 51.
- Dwidjoseputro. 1994. *Pengantar Fisiologi Tumbuhan*. Jakarta: Penerbit Gramedia Pustaka Utama.
- Harborne, J.B.1987. *Metode Fitokimia, Penuntun Cara Modern Menganalisa Tumbuhan*. Bandung: ITB Press.
- Hopkins, W.G.1995. *Introduction to Plant Physiology*. New York: John Wiley and Sons.
- Hutapea, J.R. 1993. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia* (II). Jakarta: Dep. Kes RI. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Botani.
- Islami, T., W. Hadi. 1995. *Hubungan Tanah, Air dan Tanaman*. Semarang: IKIP Press.
- Khoiriyah, S. 1999. *Pertumbuhan Gulma Teki (Cyperus rotundus L.) setelah Pemupukan Urea dan Aplikasi Herbisida Ronstar*. [Skripsi]. Yogyakarta: Fakultas Biologi UGM.
- Lakitan, B. 1996. *Fisiologi Pertumbuhan dan Perkembangan Tanaman*. Jakarta: Raja Grafindo Persada.
- Lea, J.P. and R.C. Leegood. 1993. Nitrogen metabolism. In Lea, J.P. and R.C. Leegood (eds.) *Plant Biochemistry and Molecular Biology*. New York: John Wiley and Sons.
- Listyawati, S. 1994. *Pengaruh Radiasi Sinar Gama Co 60 Terhadap Aktivitas Nitrat Reduktase dan Struktur Anatomi Brassica campestris Linn*. [Skripsi]. Yogyakarta: Fakultas Biologi UGM.
- Moko, H, E.M. Rahmat, S.M.D. Rosita. 1993. Respon merenan terhadap penggunaan zat pengatur tumbuh. *Warta Tumbuhan Obat Indonesia* 2 (4): 1-3.
- Noggle, G.R and G.J. Fritz.1983. *Introductory Plant Physiology*. 2nd edition. New Jersey: Prentice Hall Inc.
- Oleszek, W.O., R.E. Hoagland and R.M. Zablotowicz.1999. Ecological significance of plant saponins. In Inderjit, K.M.N. Dakshini and C.L. Foy (eds.) *Principles and Practices in Plant Ecology Allelochemical Interactions*. New York: CRC Press LLC.
- Pramono, S. 2002. Kontribusi bahan obat alam dalam mengatasi krisis bahan obat di Indonesia. *Jurnal Bahan Alam Indonesia* 1 (1): 18-20.
- Rahardjo M, S.M.D Rosita, Sudiarto, dan Hernani. 2000. Produktivitas dan kadar flavonoid simplisia tempuyung (*Sonchus arvensis* L.) yang diperoleh pada berbagai kondisi stress air. *Warta Penelitian dan Pengembangan Tanaman Industri* 6(2): 1-3.
- Raj, J dan K.P Singh. 2000. *Acalypha indica*. *CCRH Quarterly Bulletin*. 22 (1&2). Drug Standardisation Special-1. <http://www.ccrhindia.org/magzin/L1-1.htm>
- Salisbury, F.B. and C.W.Ross.1995. *Fisiologi Tumbuhan*. Jilid II. Penerjemah: Lukman dan Sumaryono Bandung: Penerbit ITB.
- Sitompul, S.M., dan B. Guritno. 1995. *Analisis Pertumbuhan Tanaman*. Yogyakarta: UGM Press.
- Soemantri. 1993. Masalah pengembangan teknologi sediaan fitofarmaka. *Warta Tumbuhan Obat Indonesia*. 2 (4): 4-7.
- Stahl, E. 1985. *Analisis Obat secara Kromatografi dan Mikroskopi*. Penerjemah: Kosasih Padmawinata dan Iwang Sudiro. Bandung: ITB Press.
- Sudarsono dan Mulyono. 1998. *Budidaya Tanaman Obat*. Yogyakarta: Pusat Penelitian Obat Tradisional.
- Taiz, L and E. Zeiger. 1998. *Plant Physiology*. Massachusetts: Sinauer Associates, Inc.
- Wattimena, G.A. 1988. *Zat Pengatur Tumbuh Tanaman*. Bogor: PAU IPB.
- Widiastuti, Y, J.R. Hutapea dan Suhadi. 1993. Usaha peningkatan hasil biomassa *Phyllanthus niruri* melalui pemberian asam giberelat. *Warta Tumbuhan Obat Indonesia*. 2 (4): 11-12.

Pertumbuhan Kalus dan Kandungan Minyak Atsiri Nilam (*Pogostemon cablin* (Blanco) Bth.) dengan Perlakuan Asam α -Naftalen Asetat (NAA) dan Kinetin

Callus growth and essential oil of nilam (Pogostemon cablin (Blanco) Bth.) on the treatment with α -naphtalen acetic acid and kinetin

GUNTUR TRIMULYONO¹, SOLICHATUN^{1,*}, SOERYA DEWI MARLIANA²

¹Jurusan Biologi FMIPA Universitas Sebelas Maret Surakarta 57126.

²Jurusan Kimia FMIPA Universitas Sebelas Maret Surakarta 57126.

* Korespondensi: Jl. Ir. Sutami 36A Surakarta 57126. Tel. & Fax.: +62-271-663375. e-mail: olich@mipa.uns.ac.id.

Diterima: 22 Juli 2002. Disetujui: 11 Maret 2003.

Abstract. The objectives of the research were to study the effect of adding of α - naphtalene acetic acid (NAA) and kinetin on callus growth and essential oil production from nilam (*Pogostemon cablin* (Blanco) Bth.) callus culture. The outline of the research was the callus growth and secondary metabolite production from plant's body could be triggered by the occurrence of plant growth regulation. The addition NAA and kinetin in culture's medium would influence cell proliferation and synthesis of protein, so that both can induce callus growth and secondary metabolism production from the cell that has been cultured. According to the research objectives, the research was done by using in vitro callus culture method to obtain callus from explant P. cablin leaf and to induce essential oil production. In vitro culture process consist of two stages. First stage was the callus initiation medium induced the callus from explant. The experiment was done by medium Murashige-Skoog (MS) with 2,4-D 0,5 mg/l and kinetin 0.5 mg/l; and the second stage was the medium treatment induced callus growth and essential oil production. The research used factorial completely randomized design with two factors (NAA concentration: 0mg/l, 0,5 mg/l, 1,0 mg/l, 2,0 mg/l; and kinetin concentration: 0 mg/l, 0,5 mg/l, 1,0 mg/l, 2,0 mg/l) with 3 replicates. The collected data were qualitative data (callus morphology include texture and colour callus) and quantitative data (callus growth rate, callus dry weight and essential oil content). Data were analyzed by Anova and followed by DMRT 5% confidence level and correlation regression. The result of the research indicated the treatment with additional plant growth regulation (NAA and kinetin) on Murashige-Skoog's medium had significant effect on callus growth rate but it didn't have significant effect on callus dry weight and the increase of produced essential oil.

Keywords: *Pogostemon cablin* (Blanco) Bth., growth rate, in vitro, essential oil.

PENDAHULUAN

Komoditas minyak nilam dalam dunia perdagangan internasional sering disebut *patchouli oil* dan merupakan salah satu produk minyak atsiri (*essential oil*). Minyak nilam merupakan bahan baku yang penting untuk industri wewangian dan kosmetika. Minyak nilam mempunyai sifat-sifat sukar tercuci, sukar menguap dibandingkan dengan minyak atsiri lainnya, dapat larut dalam alkohol dan dapat dicampur dengan minyak atsiri lainnya. Berdasarkan sifat itulah minyak nilam dipakai sebagai fiksatif untuk industri wewangian (Santoso, 1991).

Minyak nilam sampai saat ini belum dapat dibuat secara sintesis. Oleh karena itu minyak nilam konvensional mempunyai prospek yang cukup cerah. Minyak nilam sebagian besar masih diekspor ke luar negeri karena di negara kita belum ada industri parfum yang berarti (Daud, 1991). Industri kimia terutama dalam hal ini adalah industri farmasi merupakan industri yang didukung oleh senyawa-senyawa alami dari tumbuhan. Sampai batas tertentu senyawa-senyawa alami tumbuhan tidak

dapat digantikan karena bioaktivitasnya sebagai bahan penyembuh (Wattimena dkk., 1992).

Penelitian ini diarahkan untuk mengkaji pengaruh zat pengatur tumbuh terhadap pertumbuhan kalus dan produksi minyak atsiri nilam (*Pogostemon cablin* (Blanco) Bth.), yang ditanam pada media MS secara *in vitro*. Dari penelitian ini diharapkan diketahui kombinasi zat pengatur tumbuh yang optimum bagi pertumbuhan kalus dan sintesis minyak atsiri nilam. Jenis zat pengatur tumbuh yang digunakan dari golongan auksin adalah NAA dan dari golongan sitokinin adalah kinetin.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober 2002 s.d. April 2003 di Laboratorium Pusat MIPA Universitas Sebelas Maret Surakarta. Penelitian ini adalah penelitian kuantitatif. Rancangan percobaan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap (RAL) dengan dua faktor. Faktor pertama adalah konsentrasi NAA dengan macam konsentrasi 0; 0,5;

1,0; dan 2 mg/l. Sedangkan faktor kedua adalah konsentrasi kinetin dengan macam konsentrasi 0; 0,5; 1,0; dan 2 mg/l. Masing-masing perlakuan dengan 3 ulangan. Dari kedua faktor perlakuan tersebut didapatkan 16 macam kombinasi perlakuan. Pelaksanaan penelitian dibagi dalam 3 tahapan meliputi: tahap persiapan, tahap penanaman eksplan serta tahap pengamatan, pengukuran dan pengujian.

Analisis data dilakukan terhadap laju pertumbuhan, produksi biomassa dan kandungan minyak atsiri dengan menggunakan analisis varian pola dua arah untuk mencari beda nyata antar perlakuan, dilanjutkan dengan uji DMRT pada taraf uji 5%. Sedangkan untuk mengetahui hubungan antara laju pertumbuhan dan berat kering kalus dengan kandungan minyak atsiri nilam dilakukan analisis regresi dan korelasi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Morfologi kalus

Penggunaan auksin (2,4-D) dan sitokinin (kinetin) dengan konsentrasi 0,5 mg/l mampu menginduksi terbentuknya kalus dari eksplan yang berasal dari daun nilam (*Pogostemon cablin*). Pada konsentrasi tersebut, 2,4-D dan kinetin mampu merangsang sel daun melakukan proses dediferensiasi membentuk kalus. Inisiasi kalus mulai terlihat pada perlakuan daun pada saat kultur berumur 7-9 hari. Kalus yang terbentuk memiliki kenampakan tekstur yang remah dan berwarna putih kekuningan. Pada kultur jaringan, morfogenesis dari eksplan selalu tergantung dari interaksi dari auksin dan sitokinin (Wattimena dkk., 1992).

Kalus setelah berumur 15-17 hari mengalami perubahan warna menjadi kuning bening dengan tekstur yang masih sama. Kalus menjadi berwarna kuning kecoklatan setelah berumur 28-30 hari, hal ini kemungkinan karena terbentuknya senyawa fenol dari jaringan dan semakin dewasanya umur kalus. Kalus harus disubkultur ke media yang sama dengan tujuan untuk mengganti media dengan yang baru agar pertumbuhan kalus tidak terhambat akumulasi senyawa fenol, hal ini sekaligus digunakan untuk memperbanyak kalus. Subkultur dilakukan pada saat kalus berumur 5 minggu dan dilakukan hanya sekali. Semakin banyak disubkultur maka kemampuan regenerasi (totipotensi) eksplan semakin hilang (Sriyanti dan Wijayani, 1994).

Kalus yang diperoleh dari media inisiasi berwarna kuning kecoklatan yang merupakan warna awal kalus pada saat dipindahkan ke dalam media perlakuan. Warna kalus mengalami perubahan setelah ditumbuhkan pada media perlakuan, penampakan kalus pada awal minggu kedua muncul warna kuning bening disebabkan tumbuhnya kalus baru setelah diperlakukan dalam media perlakuan.

Ukuran kalus baru yang muncul berbeda-beda pada tiap perlakuan. Hal ini dimungkinkan karena masing-masing kalus memiliki kepekaan dan daya serap terhadap media yang berbeda serta adanya pengaruh dari zat pengatur tumbuh yang diberikan.

Memasuki masa inkubasi pada minggu ketiga warna kalus mulai bervariasi seiring dengan pertumbuhan kalus, kebanyakan kalus berubah warna menjadi lebih coklat namun ada beberapa kalus yang tetap berwarna kuning kecoklatan dan coklat muda.

Hasil tersebut memperlihatkan pengaruh pemberian kinetin terhadap warna kalus berkaitan dengan peran kinetin dalam proses pembelahan sel dan sintesis protein, disamping itu sitokinin (kinetin) mampu memperlambat proses senesensi (Wattimena dkk., 1992). Warna kalus yang terlihat lebih coklat atau mengarah ke coklat tua mungkin disebabkan adanya senyawa fenol dari jaringan. Menurut Wattimena (1991), senyawa-senyawa fenol dapat menghambat pembelahan sel, pembesaran sel dan pertumbuhan. Tekstur kalus yang diperlihatkan pada media perlakuan mempunyai susunan sel-sel yang remah sehingga mudah dipisah-pisahkan. Tekstur tidak berubah baik sebelum maupun sesudah diperlakukan.

Pemberian NAA mampu memacu pertumbuhan kalus pada kultur daun *P. cablin*. Pemberian NAA dan kinetin menjadikan kalus terus mengalami pertumbuhan. Kalus yang dihasilkan secara umum memperlihatkan pertambahan berat 3 kali lipat dari berat kalus awal sebelum perlakuan. Sriyani dan Wijayani (1994), auksin dapat meningkatkan tekanan osmotik, meningkatkan sintesis protein, meningkatkan permeabilitas sel terhadap air dan melunakkan dinding sel yang diikuti menurunnya tekanan dinding sel, sehingga air dapat masuk ke dalam sel yang disertai kenaikan volume sel.

Fosket dkk (1981) dalam Salisbury dan Ross (1991), mengatakan bahwa sitokinin mendorong pembelahan sel dalam kultur jaringan dengan cara mempersingkat waktu berlangsungnya fase S dalam siklus sel (dari G₂ ke mitosis), hal ini terjadi karena sitokinin menaikkan laju sintesis protein. Beberapa protein tersebut berupa protein pembangun atau enzim yang dibutuhkan untuk mitosis.

Laju pertumbuhan kalus

Pemberian variasi konsentrasi NAA dan kinetin menghasilkan laju pertumbuhan kalus yang berbeda nyata pada uji DMRT 5% (Tabel 1.). Laju pertumbuhan kalus tertinggi adalah 151,1 mg/hari pada perlakuan dengan pemberian 2 mg/l NAA dan 1 mg/l kinetin pada masa inkubasi 5 minggu (Gambar 5). Pertumbuhan kalus mulai terlihat pada saat kalus berumur 7-9 hari dengan munculnya kalus-kalus baru yang berwarna kuning bening hingga selama masa inkubasi 4-5 minggu.

Tabel 1. Laju pertumbuhan kalus *P. cablin* (mg/hari).

Penambahan Kinetin	Penambahan NAA			
	0 mg/l	0,5 mg/l	1 mg/l	2 mg/l
0 mg/l	69,40bcd	69,1bcd	79,9abcd	47,9d
0,5 mg/l	130,2ab	123,5abc	119,6abcd	102,8abcd
1 mg/l	75,4bcd	126,5ab	100,3abcd	151,1a
2 mg/l	118,6abcd	84,2abcd	48,7cd	106,5abcd

Keterangan: Angka-angka yang diikuti huruf yang berbeda pada kolom dan baris menunjukkan ada beda nyata pada uji DMRT taraf 5%.

Zat pengatur tumbuh sangat diperlukan sebagai komponen media bagi pertumbuhan dan diferensiasi kalus. Tanpa penambahan zat pengatur tumbuh dalam media, pertumbuhan akan terhambat bahkan mungkin tidak tumbuh sama sekali. Pembentukan kalus dan organ-organ ditentukan oleh penggunaan yang tepat dari zat pengatur tumbuh tersebut (Sriyanti dan Wijayani, 1994).

Auksin (NAA) 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). Sitokinin (kinetin) yang ditambahkan berperan dalam pembelahan sel dan sintesis protein. Pemacu pembelahan sel dan sintesis protein oleh kinetin menyebabkan sel berproliferasi, akibatnya volume sel bertambah sehingga menyebabkan bertambahnya berat kalus yang dihasilkan. Adanya kenaikan sintesis protein akibat pengaruh NAA dan kinetin maka dapat digunakan sebagai sumber tenaga dalam pertumbuhan (Wattimena, 1991).

Pertumbuhan memerlukan penyerapan air yang berarti bahwa sel tersebut harus mempertahankan potensial airnya agar selalu negatif daripada potensial air larutan disekitarnya. Pemberian auksin menyebabkan sel penerima mengeluarkan ion H^+ ke dinding sel yang mengelilinginya dan ion H^+ ini kemudian menurunkan pH sehingga terjadi pengenduran dinding sel dan pertumbuhan yang cepat. Diduga pH rendah inilah yang bekerja mengaktifkan beberapa enzim perusak dinding sel tertentu, yang tidak aktif pada pH yang lebih tinggi. Enzim tersebut diduga memutuskan ikatan pada polisakarida dinding sel sehingga memungkinkan dinding sel lebih meregang (Salisbury dan Ross, 1991).

Sel-sel dapat mengembang, dengan masuknya air akan menyebabkan dinding sel mengembang sampai pada suatu tekanan dinding sel tertentu yang dapat menghalangi absorpsi air selanjutnya. Dinding-dinding sel yang retak oleh pengembangan sel akan diperbaiki dengan penambahan bahan dinding sel baru. Longgarnya dinding sel menyebabkan berkurangnya tekanan dinding sel, sehingga air akan masuk ke dalam sel dan terjadilah keseimbangan yang baru. Bahan-bahan dinding sel yang baru, ditimbun kembali pada bagian-bagian dinding sel yang telah menggeser atau retak itu. Pengaruh auksin dalam hal ini adalah pada proses yang menyebabkan bergesernya dinding sel tersebut (Wattimena, 1991).

Menurut Wattimena dkk. (1992), terdapat sekelompok gen yang dapat mengatur perubahan pola pertumbuhan sehingga proses proliferasi sel dan morfogenesisnya dapat berjalan. Seperti gen-gen yang mengatur konsentrasi yang efektif dari zat-zat yang dapat mendorong pertumbuhan. Pengaruh zat pengatur tumbuh untuk suatu proses morfogenesis atau pertumbuhan dan perkembangan merupakan kerjasama dari dua atau lebih zat pengatur tumbuh. NAA dan kinetin sangat dibutuhkan untuk proliferasi dan pertumbuhan kalus *P. cablin*.

Pengaruh NAA terlihat tidak memiliki beda nyata pada taraf uji 5% sedangkan pemberian kinetin memberikan pengaruhnya yang berbeda nyata pada taraf uji 5% terhadap laju pertumbuhan kalus *P. cablin*. Pemberian kinetin ternyata mampu memacu pembelahan sel yang ditunjukkan dengan meningkatnya laju pertumbuhan kalus. Pengaruh kinetin terhadap laju pertumbuhan kalus *P. cablin* diduga berkaitan dengan perannya dalam memacu pembelahan sel dan sintesis protein. Sifat paling penting dari sitokinin adalah perangsangannya terhadap pembelahan sel (Wilkins, 1989). Menurut Sriyanti dan Wijayani (1994), macam dan kombinasi penggunaan zat pengatur tumbuh pada media kultur jaringan sangat tergantung pada jenis tanamannya. Menurut Lakitan, (1996), pengaruh zat pengatur tumbuh tergantung pada kondisi anatomi dan fisiologi dari sel yang dipengaruhi dan tidak semua sel menjadi sasaran hormon tertentu.

Tabel 1. terlihat beberapa perlakuan mempunyai laju pertumbuhan yang lebih rendah daripada kontrol, hal ini mungkin disebabkan karena eksplan daun *P. cablin* yang dikulturkan tidak sama kondisi fisiologisnya meski sama-sama diambil dari daun ketiga. Kalus hasil inisiasi juga dimungkinkan mempunyai daya serap yang berlainan karena sel yang telah tua mempunyai daya serap yang lebih rendah dibandingkan sel yang muda. Struktur kalus yang merupakan kumpulan dari banyak sel menyebabkan sel-sel yang berada di lapisan dalam tidak dapat mengadakan kontak langsung dengan media. Setiap jaringan tanaman mempunyai perbedaan kepekaan terhadap zat pengatur tumbuh dan tergantung pada konsentrasinya.

Siklus sel berpengaruh terhadap proses pembelahan sel dan sintesis protein, hal ini akan mempengaruhi laju pertumbuhan kalus. Menurut Lakitan (1996), setiap sel dapat memiliki siklus sel yang berbeda tidak hanya antar spesies tetapi juga antar individu dari spesies yang sama, hal tersebut dipengaruhi oleh lingkungan atau perlakuan saat perkembangan pada pohon induknya dan saat perkembangan pada pohon induknya. Sehingga perlakuan yang bervariasi dengan adanya kombinasi NAA dan kinetin menunjukkan laju pertumbuhan yang berbeda.

Pertumbuhan sel umumnya tinggi pada pemberian 0,5-2,0 mg/l kinetin pada semua konsentrasi NAA yang digunakan (Tabel 1.). Hal ini mungkin dikarenakan pengaruh kinetin dalam pembelahan sel dan sintesis protein pada kalus disamping berpengaruh NAA terhadap pembesaran sel, permeabilitas sel dan sintesis protein. Sedangkan perlakuan dengan menggunakan NAA tanpa penambahan kinetin menunjukkan pertumbuhan yang lebih rendah dibandingkan perlakuan NAA yang ditambahkan bersama dengan kinetin pada konsentrasi tersebut, mungkin disebabkan pengaruh NAA jika ditambahkan tanpa pemberian kinetin terhadap pertumbuhan kalus *P. cablin* kurang begitu besar dibandingkan apabila NAA ditambahkan bersama dengan kinetin. Data tersebut menunjukkan interaksi sinergisme antara NAA dan kinetin dalam memacu pertumbuhan kalus

P. cablin sehingga diperoleh laju pertumbuhannya tinggi.

Hal sama ditunjukkan kultur *Lyquidambar styraciflua* pada media yang menggunakan NAA dengan konsentrasi 0,5 dan 2,0 mg/l yang dikombinasikan dengan 0 dan 0,1 mg/l BA memperlihatkan hasil yang menunjukkan bahwa kalus mengalami pertumbuhan tertinggi pada pemberian konsentrasi 0,5 mg/l NAA dan 0,1 mg/l BA. Pemberian 2,0 mg/l NAA dan 0,1 mg/l BA juga menunjukkan pertumbuhan yang sangat tinggi dibandingkan perlakuan 0,5 dan 2,0 mg/l NAA tanpa BA. Hal ini menunjukkan bahwa perlunya sitokinin disamping auksin dalam memacu pertumbuhan sel (Ishimaru, 1996).

Pentingnya peranan sitokinin juga ditunjukkan pada penelitian terhadap sel-sel dari biji tembakau yang dipotong kemudian dikulturkan dalam media buatan, ternyata tidak dapat tumbuh. Sel-sel tersebut memanjang tetapi tidak membelah pada saat auksin ditambahkan ke media kultur. Namun sel-sel mulai membelah secara cepat dan membentuk massa dari sel-sel yang tidak terorganisasi (kalus) pada saat kinetin ditambahkan bersama-sama dengan auksin. Oleh karena itu, kehadiran dari kedua zat tumbuh tersebut diperlukan untuk pembelahan sel. Jumlah pembelahan sel meningkat secara proposional sesuai dengan konsentrasi penambahan sitokinin jika auksinnya tidak terbatas (Scragg, 1997).

Penelitian yang dilakukan Hernani dan Syahid (2001), juga menunjukkan hal yang sama, pada kultur kalus *Orthosiphon aristatus* pemberian 0,1 mg/l 2,4-D memberikan hasil terbaik dalam meningkatkan pertumbuhan. Pemberian 0,1 mg/l 2,4-D dan 0,5 mg/l BA dapat merangsang pertumbuhan kalus sehingga berat kalus yang dihasilkan cenderung meningkat. Berat kalus tertinggi diperoleh pada perlakuan 0,1 mg/l 2,4-D dan 0,5 mg/l BA pada umur 5 minggu yaitu sebesar 6,59 g dan tidak berbeda nyata dengan perlakuan 0,1 mg/l 2,4-D dan 1,0 mg/l BA yaitu 6,33 g.

Berat kering kalus

Data yang diperoleh dari hasil pengukuran berat kering ternyata tidak menunjukkan beda nyata antar perlakuan. Secara umum jika dilihat dari data yang diperoleh berat kering kalus hampir seragam atau tidak terjadi perbedaan yang cukup jauh. Pemberian 2 mg/l NAA dan 0,5 mg/l kinetin terlihat efektif dalam memproduksi biomassa yang ditunjukkan dengan berat kering kalus sebesar 290,9 mg (Tabel 2.). Data yang diperoleh memperlihatkan bahwa biomassa yang dihasilkan sejalan dengan laju pertumbuhan kalus pada konsentrasi tersebut.

Biomassa yang dihasilkan pada kultur jaringan sangat tergantung pada kecepatan sel-sel tersebut membelah diri, memperbanyak diri yang dilanjutkan dengan pembesaran sel. Kecepatan sel membelah diri dapat dipengaruhi oleh adanya kombinasi auksin-sitokinin tertentu dalam konsentrasi yang tertentu tergantung pada tanamannya, juga faktor-faktor dari luar lainnya seperti intensitas cahaya dan temperatur (Wattimena dkk., 1992) (Tabel 2.).

Tabel 2. Berat Kering Kalus *P. cablin* (mg).

Pemberian Kinetin	Pemberian NAA			
	0 mg/l	0,5 mg/l	1 mg/l	2 mg/l
0 mg/l	257,3 ^a	243,5 ^a	217,8 ^a	235,7 ^a
0,5 mg/l	254,1 ^a	265,2 ^a	265 ^a	290,9 ^a
1 mg/l	245,8 ^a	280,8 ^a	256,5 ^a	278,2 ^a
2 mg/l	262,5 ^a	252,3 ^a	198,2 ^a	260,7 ^a

Keterangan: Angka-angka yang diikuti huruf yang berbeda pada kolom dan baris menunjukkan ada beda nyata pada uji DMRT taraf 5%.

NAA dan kinetin yang ditambahkan ke dalam media diduga mempengaruhi produksi biomassa dengan jalan mempengaruhi kerja enzim-enzim tertentu yang berhubungan dengan proses metabolisme dan sintesis protein. Pada penelitian yang dilakukan oleh Abdullah *et al.* (1998), pada kultur *Rubia cordifolia* diketahui bahwa pertumbuhan sel umumnya tinggi pada pemberian 0 dan 0,5 mg/l NAA yang dikombinasikan dengan 0, 0,5, 1,0 dan 2 mg/l kinetin, hal ini terlihat dari berat kering kalus yang diperoleh yaitu sebesar 16-17%. Hal yang sama terjadi pada penelitian kultur kalus *Mentha piperita* Linn. yang dilakukan oleh Gati dan Mariska (1992), kombinasi 2,4-D dengan kinetin memberikan hasil yang lebih baik dibandingkan kombinasi 2,4-D dan BA. Kombinasi perlakuan yang terbaik adalah pada 0,1 mg/l 2,4-D dan 1 mg/l kinetin dengan berat basah sebesar 3,86 g dan berat kering 0,27 g. Pemberian zat pengatur tumbuh tersebut memberikan pengaruhnya yang berbeda nyata terhadap berat kering kalus.

Auksin berpengaruh terhadap pelonggaran atau pergeseran dinding sel dengan melepaskan ikatan-ikatan hidrogen pada xyloglucan. Ikatan-ikatan hidrogen ini dipengaruhi terutama oleh ion H⁺. Untuk perpanjangan suatu jaringan diperlukan pH sekitar 4,0 sehingga diperlukan adanya ion H⁺ pada dinding sel. Peranan auksin pada proses ini adalah dengan mengaktifkan pompa ion yaitu proses pengangkutan ion H⁺ melalui plasma membran yang menyebabkan kenaikan atau penimbunan ion H⁺ pada dinding sel dan pelonggaran pada dinding sel. Setelah sel membesar dan berelongasi dinding sel diperbaiki dari retak-retak yang terjadi (distabilisasikan). Termasuk dalam proses ini adalah pembuatan bahan-bahan dinding sel baru untuk perbaikan komponen dinding sel yang retak yang disebabkan oleh pergeseran penyusun dinding sel tersebut (Wattimena, 1991).

Menurut Abidin (1990), auksin dapat merubah aktivitas enzim-enzim yang berperan dalam sintesis komponen-komponen dinding sel dan menyusunnya kembali dalam suatu matriks dinding sel yang utuh sehingga akan berpengaruh terhadap berat sel. Sitokinin berperan dalam metabolisme asam nukleat dan sintesis protein. Dengan perubahan metabolisme tersebut pada daerah tempat diberikannya sitokinin akan menyebabkan terjadinya penimbunan asam-asam amino, fosfat, gula dan bahan-bahan lain (Wattimena, 1991).

Berat basah kalus akhir yang diperoleh dari hasil penelitian menunjukkan beda nyata antar perlakuan begitu juga dengan laju pertumbuhan kalus. Namun

berat kering kalus yang diperoleh tidak menunjukkan beda nyata, hal ini dimungkinkan karena kalus yang diperoleh setelah perlakuan lebih banyak mengandung air sehingga pada saat proses pengeringan, air akan menguap yang akan mempengaruhi berat kering kalus. Jika dilihat pada Gambar 5 dan 6 secara umum ada kesamaan pola antara produksi biomassa dengan laju pertumbuhan, hal tersebut menunjukkan bahwa laju pertumbuhan kalus sejalan dengan produksi biomassa kalus. Pada kontrol (0 mg/l NAA dan 0 mg/l kinetin) ternyata memperlihatkan produksi biomassa yang cukup tinggi. Kalus tersebut tidak dipengaruhi oleh zat pengatur tumbuh eksogen (NAA dan kinetin) sehingga menunjukkan biomassa yang dihasilkan juga akan berbeda dengan kalus yang memperoleh perlakuan. NAA akan meningkatkan permeabilitas sel sehingga difusi masuknya air ke dalam sel akan meningkat sedangkan kinetin berperan dalam sintesis protein. Kalus yang mendapatkan perlakuan lebih banyak menyimpan air sehingga berat keringnya ada yang dibawah kontrol. Galston (1941) dalam Abidin (1990), menerangkan bahwa jumlah larutan yang ada didalam sel meningkat pada sel yang diberi perlakuan auksin (IAA). Menurut Wattimena (1991), auksin mendorong terjadinya elongasi sel yang diikuti dengan pembesaran sel dan meningkatnya berat basah. Peningkatan berat basah terutama disebabkan oleh meningkatnya penyerapan air oleh sel tersebut.

Kandungan minyak atsiri *P. cablin*

Data yang diperoleh ternyata tidak terdapat beda nyata terhadap kandungan minyak atsiri *P. cablin*. Pemberian NAA dan kinetin tidak berpengaruh nyata terhadap sintesis minyak atsiri. Namun demikian kandungan minyak atsiri diperoleh pada pemberian 2 mg/l NAA dan 2 mg/l kinetin dapat mencapai 0,4173% (Tabel 3.).

Kandungan minyak atsiri yang diperoleh ternyata memiliki korelasi yang negatif terhadap laju pertumbuhan dan berat kering kalus. Hal tersebut menunjukkan bahwa minyak atsiri tidak disintesis pada saat pertumbuhan memasuki fase eksponensial. Pada fase ini, terjadi peningkatan laju pertumbuhan yang diikuti dengan produksi biomassa. Hal ini menunjukkan bahwa sintesis minyak atsiri tidak berhubungan dengan produksi biomassa.

Berbagai perlakuan pada kultur jaringan dapat dilakukan untuk menghasilkan senyawa yang diinginkan sebanyak mungkin. Sebagai contoh betasianin dan senyawa pigmen dihasilkan maksimum pada saat fase log sedangkan antosianin maksimum diproduksi pada saat fase stasioner (Wattimena dkk., 1992). Menurut Drapeau *et al.* (1986) dalam Toruan *et al.* (1990), pada kultur *Costus speciosus* rendahnya sintesis diosgenin pada awal masa inkubasi erat kaitannya dengan terjadinya akumulasi hasil pengubahan salah satu prekursor perantara untuk pembentukan diosgenin yaitu furostanol menjadi glikosida diosgenin. Senyawa ini diakumulasi selama proses

pertumbuhan sel tinggi, selanjutnya senyawa ini akan diubah menjadi diosgenin mengikuti menurunnya pertumbuhan sel. Oleh karena itu produksi diosgenin sel tidak berkorelasi dengan kecepatan tumbuh sel.

Berdasarkan hal tersebut kemungkinan pemberian zat pengatur tumbuh NAA dan kinetin pada media perlakuan oleh kalus lebih diarahkan untuk pertumbuhan dan produksi biomassa kalus dibandingkan untuk sintesis minyak atsiri. Sintesis minyak atsiri belum terjadi pada tahap pertumbuhan kalus dan baru disintesis pada saat sel mengalami diferensiasi menjadi suatu organ. Kandungan minyak atsiri kalus *P. cablin* dicantumkan pada Tabel 3.

Tabel 3. Kandungan Minyak Atsiri Kalus *P. cablin* (%).

Pemberian Kinetin	Pemberian NAA			
	0 mg/l	0,5 mg/l	1 mg/l	2 mg/l
0 mg/l	0,146 ^{ab}	0,165 ^{ab}	0,329 ^{ab}	0,114 ^{ab}
0,5 mg/l	0,257 ^{ab}	0,094 ^{ab}	0,314 ^{ab}	0,084 ^{ab}
1 mg/l	0,298 ^{ab}	0,061 ^{ab}	0,035 ^b	0,123 ^{ab}
2 mg/l	0,158 ^{ab}	0,295 ^{ab}	0,190 ^{ab}	0,417 ^a

Keterangan: Angka-angka yang diikuti huruf yang berbeda pada baris dan kolom menunjukkan ada beda nyata pada uji DMRT taraf 5%.

Produksi senyawa metabolit sekunder tergantung pada tahap-tahap perkembangan organisme yang menghasilkannya. Diferensiasi sel menentukan sintesis senyawa tersebut. Pada kultur *in vitro* produksi senyawa metabolit sekunder seringkali berasosiasi dengan diferensiasi sel atau jaringan yang dikulturkan. Meskipun banyak senyawa metabolit sekunder berhasil diproduksi oleh sel tetapi jumlah senyawa tersebut kadang-kadang lebih rendah daripada apabila sel tersebut berdiferensiasi membentuk organ lain. Hal ini ditunjukkan pada kandungan senyawa vinblastin dan vincristin pada *Catharantus roseus*, daun hasil kultur jaringan lebih tinggi daripada kalus sehingga untuk mendapatkan alkaloid tersebut dalam jumlah besar dengan teknik kultur jaringan, eksplan yang ditanam harus diarahkan untuk membentuk daun daripada membentuk kalus (Wattimena dkk., 1992). Ernawati (1990) dalam Wattimena dkk. (1992) menyebutkan bahwa pada kultur *Polygonum tinctorium* Ait, senyawa anti jamur (*antifungal compound*) yang dihasilkan oleh akar berambut jumlahnya lebih besar daripada yang dihasilkan oleh kalus.

Penelitian yang dilakukan oleh Rahmawati (1999), pada kultur dengan eksplan daun *P. cablin* untuk mengetahui pengaruh KH_2PO_4 terhadap sintesis minyak atsiri menunjukkan hal tersebut. Penelitian diarahkan pada terbentuknya tunas yang diperoleh dari kultur *in vitro*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terjadi kenaikan kandungan *patchouli alcohol* sejalan dengan kenaikan konsentrasi KH_2PO_4 . Jika dibandingkan dengan penelitian yang dilakukan menunjukkan bahwa minyak atsiri nilam diproduksi pada saat sel mengalami diferensiasi membentuk organ atau

tanaman dan bukan pada saat sel membentuk kalus. Rendahnya akumulasi senyawa atsiri dalam kultur kalus mungkin disebabkan karena beberapa bentuk diferensiasi dibutuhkan untuk produksi minyak atsiri tersebut. Hal ini terlihat pada beberapa kasus bahwa peningkatan diferensiasi diikuti juga dengan akumulasi metabolit sekunder (Scragg, 1997)

Ozeki dan Komamine dalam Wattimena dkk. (1992), melaporkan bahwa adanya korelasi antara diferensiasi metabolik dengan diferensiasi morfologis pada kultur suspensi wortel. Antosianin yang dihasilkan berkorelasi dengan embriogenesis yang diinduksi dengan 2,4-D. Selain diferensiasi, ekspresi senyawa metabolit sekunder juga tergantung pada regulasi jumlah dan aktivitas enzim yang terlibat dan biosintesis senyawa tersebut. Jumlah dan aktivitas enzim tersebut sering diinduksi oleh pemicu (*trigger*) yang dalam kultur jaringan salah satunya adalah penggunaan zat pengatur tumbuh. Pemicu ini akan menginduksi sintesis protein enzim yang ekspresinya tergantung pada sintesis RNA dan protein. Peningkatan jumlah enzim yang terlibat dalam metabolisme sekunder juga akan meningkatkan senyawa metabolit sekunder. Tidak didapatkan pola-pola tertentu penggunaan auksin maupun sitokinin untuk merangsang senyawa-senyawa metabolit sekunder.

Pemberian NAA dan kinetin sebenarnya diarahkan untuk meningkatkan pembesaran sel, pembelahan sel dan sintesis protein dengan meningkatkan metabolisme enzim-enzim yang terdapat di dalam sel. Namun pada kenyataannya laju pertumbuhan dan berat kering tidak memiliki pola perubahan yang sama dengan sintesis minyak atsiri nilam. Hal ini dimungkinkan karena sel-sel yang membangun kalus mempunyai fase pertumbuhan yang tidak seragam, menyebabkan aktivitas protein di dalam setiap sel juga berbeda yang dapat mengurangi jumlah senyawa yang dihasilkan dan jumlah enzim yang berperan dalam sintesis minyak atsiri hanya sedikit. Menurut Rahmawati (1999), rendahnya kadar *patchouli oil* dalam tunas hasil kultur *in vitro* mungkin diakibatkan usianya yang masih terlalu muda (masa penanaman yang terlalu singkat).

Dodds dan Robert (1983) dalam Rahmawati (1999), menyatakan bahwa sebelum inisiasi kultur jaringan terjadi tiga fase: fase log (fase penyesuaian), fase eksponensial (fase pembelahan sel, kecepatan pertumbuhan sel mencapai maksimum), fase stasioner (fase dimana tidak ada lagi pertumbuhan). Pada fase stasioner pertumbuhan sel terhenti dan selama inilah terjadi produksi metabolit sekunder. Pada fase pertumbuhan (eksponensial) biosintesis metabolit sekunder amat lambat bahkan seringkali belum dimulai. Diduga pada akhir masa perlakuan (saat pemanenan) kalus masih berada pada awal fase stasioner atau bahkan masih berada pada fase eksponensial, sehingga

meskipun telah dapat memproduksi minyak atsiri tetapi jumlahnya masih sangat sedikit.

KESIMPULAN

Penambahan NAA dan kinetin dalam media dapat meningkatkan laju pertumbuhan kalus *Pogostemon cablin* (Blanco) Bth dan tidak dapat meningkatkan kandungan minyak atsiri pada kalus *Pogostemon cablin* (Blanco) Bth. Pengaruh penambahan NAA dan kinetin yang optimum terhadap laju pertumbuhan kalus *Pogostemon cablin* (Blanco) Bth. diperoleh pada konsentrasi 2 mg/l NAA dan 1,5 mg/l kinetin.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah, M.A., A.M. Ali, M. Marziah, N.H. Lajis, A.B. Ariff. 1998. Establishment of cell suspension cultures of *Morinda elliptica* for production of anthraquinones. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 54: 173-182.
- Abidin, Z. 1990. *Dasar-Dasar Pengetahuan Tentang Zat Pengatur Tumbuh*. Bandung: Penerbit Angkasa.
- Daud, A. 1991. *Nilam Budidaya dan Penyulingan*. Jakarta: CV Yasaguna.
- Gati, E. dan I. Mariska. 1992. Pengaruh auksin dan sitokinin terhadap pertumbuhan kalus **Mentha piperita** Linn. *Littri* 3: 1-4.
- Hernani dan S.F. Syahid. 2001. Pengaruh zat pengatur tumbuh terhadap pembentukan dan pertumbuhan serta kandungan sinensetin dalam kalus pada tanaman kumis kucing (**Orthosiphon aristatus**). *Littri*. 4: 99-103.
- Ishimaru, K. 1996. **Liquidambar styraciflua** (Sweet Gum): in vitro culture and the production of tanins and other phenolic compounds. *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 37: 169-185.
- Lakitan, B. 1996. *Fisiologi Pertumbuhan dan Perkembangan Tanaman*. Jakarta: PT. Raja Grafindo Persada.
- Rahmawati, E.S. 1999. *Variasi Kadar Kalium Dihidrogenafosfat dalam Medium MS terhadap Sintesis Minyak Atsiri pada Tunas Hasil Kultur In Vitro Daun Nilam Aceh (Pogostemon cablin)* (Blanco) Bth.). Skripsi. Yogyakarta. Fakultas Biologi UGM.
- Salisbury, F. B dan C.W. Ross. 1992. *Fisiologi Tumbuhan Jilid 3*. Bandung: ITB.
- Santoso, H. B. 1991. *Bertanam Nilam*. Yogyakarta: Kanisius.
- Scragg, A. H. 1997. The production of aromas by plant cell culture. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*. 55: 239-263. Berlin: Springer-Verlag.
- Sriyanti, D. P. dan A. Wijayani. 1994. *Teknik Kultur Jaringan*. Yogyakarta: Kanisius.
- Toruan, N., S. Solahudin, L. Winata, D. Sastradipradja, K. Padmawinata. 1990. Pengaruh 2,4-D, kolesterol dan radiasi Co-60 terhadap pertumbuhan dan kandungan diosgenin dalam kultur jaringan *Costus speciosus*. *Forum Pasca Sarjana* 13 (1): 1-14.
- Wattimena, G. A. 1991. *Zat Pengatur Tumbuh Tanaman*. Bogor: Pusat Antar Universitas IPB.
- Wattimena, G.A., L.W. Gunawan, N.A. Mattjik, E. Syamsudin, N.M.A. Wiendi, A. Ernawati. 1992. *Bioteknologi Tanaman*. Bogor: Pusat Antar Universitas IPB.
- Wilkins, M. B. 1989. *Fisiologi Tanaman*. Penerjemah: Sutedja, M.M dan Kartosapoetra. Jakarta: PT. Bina Aksara.

Aktifitas Hipoglikemik dan Hipolipidemik Ekstrak Air Daun Bungur (*Lagerstroemia speciosa* [L.] Pers.) terhadap Tikus Diabetik

Hypoglycaemic and hypolipidaemic activities of water extract of Lagerstroemia speciosa (L.) Pers. leaves in diabetic rat

UDHI EKO HERNAWAN*, SUTARNO, AHMAD DWI SETYAWAN**

Jurusan Biologi FMIPA Universitas Sebelas Maret Surakarta 57126.

Korespondensi: Jl. Ir. Sutami 36A Surakarta 57126. Tel. & Fax. +62-271-663375. e-mail: *udhi_z@myquran.com, **biodiv@uns.ac.id.

Diterima: 29 Nopember 2003. Disetujui: 11 Maret 2004.

Abstract. The aim of this study was to know the hypoglycaemic and hypolipidaemic activities of water extract of bungur (*Lagerstroemia speciosa* [L.] Pers.) leaves in alloxan-induced diabetic rat. Phytochemical studies were conducted to determinate the tannin-contents of the water extract (WE). Male Wistar rats (150- 180 g BW) were used in this study. The rats were divided into six groups: normal control; diabetic control; glibenclamide; WE 0.1 g/200 g BW; WE 0.2 g/200 g BW; and WE 0.5 g/200 g BW. Dried leaves of bungur extracted with boiling water (50 g/L) for 30 minutes. The extract administered orally. Fasting blood glucose, triglyceride, and total cholesterol were determined at 0, 2, 4, 6 hours after treatment. Total phenol, ellagitannin, gallotannin, and condensed-tannin were determined from the WE. The results showed that WE exhibited hypoglycemic activity at doses 0.2 g/200 g BW and 0.5 g/200 g BW. The last dose showed similar hypoglycemic activity compared with glibenclamide. All doses showed the hypolipidemic activity higher than glibenclamide. Phytochemical studies showed that the WE containing total phenol 0.025%; ellagitannin 0.011%; gallotannin 0.0199%; and condensed-tannin 0.0167%.

Keywords: bungur leaves, hypoglycaemic, hypolipidaemic, tannin.

PENDAHULUAN

Diabetes mellitus (DM) atau kencing manis merupakan penyakit fisiologis dengan ciri utama berupa abnormalitas metabolisme glukosa. Kadar glukosa darah penderita DM mengalami kenaikan melebihi batas normal (hiperglikemik) (Maher, 2000). Penderita DM juga mengalami abnormalitas metabolisme lemak. Aktivitas lipolisis (pemecahan lemak) tidak terkendali, menyebabkan tingginya kadar asam lemak bebas, trigliserida (hipertrigliseridaemia) dan kolesterol (hiperkolesterolemia) yang memicu resiko komplikasi kardiovaskuler seperti, atherosklerosis, hipertensi, serangan jantung, dan kebutaan (Marieb, 1997; Kahn dan Flier, 2000; Dewi dkk., 2001).

Diabetes mellitus menjadi salah satu masalah kesehatan di dunia termasuk Indonesia. Pada beberapa kelompok etnis tertentu, penderita DM dapat mencapai lebih dari 10% total populasi (Baumann dan Saltiel, 2001). Pada tahun 1995, terdapat 135 juta penderita DM dan diperkirakan akan naik 122% menjadi 300 juta pada tahun 2025 di seluruh dunia (Liu *et al.*, 2001). Pada tahun 2000, diperkirakan minimal terdapat 4 juta prevalensi DM di Indonesia, sedangkan di seluruh dunia terdapat kurang lebih 175,4 juta penderita DM (Tjokroprawiro, 2000).

Terapi DM diberikan kepada penderita dengan target minimal dapat menurunkan kadar glukosa darah menjadi normal (hipoglikemik). Selain itu,

terapi DM juga diharapkan dapat mengurangi resiko komplikasi kardiovaskuler. Untuk mencapai tujuan tersebut, dikembangkan terapi DM komprehensif yang tidak hanya mengendalikan metabolisme glukosa (hipoglikemik), tetapi juga metabolisme lemak (hipolipidemik). Penelitian dan pengembangan terapi DM harus mencakup dua aspek metabolisme tersebut (Maher, 2000; Saravanan dan Pari, 2003).

Bentuk terapi yang dapat diberikan adalah dengan pengobatan dan perbaikan gaya hidup (Maher, 2000). Terapi DM dengan pengobatan dapat dilakukan dengan menggunakan obat-obatan kimiawi sintetik maupun ramuan tradisional. Terapi dengan ramuan tradisional, telah menjadi bagian dari budaya masyarakat di berbagai belahan dunia. Hampir setiap negara di dunia mempunyai kebudayaan sendiri tentang pemanfaatan alam (tumbuhan) untuk pengobatan (Lee *et al.*, 2000). Berdasarkan perkiraan WHO, lebih dari 80% penduduk di negara-negara berkembang tergantung pada ramuan tradisional untuk mengatasi masalah kesehatan mereka (Khan *et al.*, 2002).

Terapi dengan ramuan tradisional dirasakan lebih murah dengan prosedur mudah dibandingkan dengan obat kimiawi sintetik. Peluang untuk mendapatkan ramuan yang mujarab dan mudah diperoleh masih terbuka sangat lebar, mengingat potensi tanaman obat Indonesia yang tinggi dan belum dimanfaatkan semuanya. Budhi (1994) menyebutkan pentingnya penggalan informasi tentang obat-obatan tradisional melalui tahap-tahap

pengujian, penelitian, dan pengembangan secara sistematis agar pemanfaatan dan khasiatnya dapat dipertanggungjawabkan secara ilmiah.

Salah satu ramuan tradisional dari Filipina yang digunakan untuk mengobati penderita DM adalah ramuan dari daun *Lagerstroemia speciosa* (L.) Pers. atau bungur. Namun di Indonesia, ekstrak daun bungur belum dimanfaatkan sebagai ramuan anti-diabetik. Padahal, beberapa laporan penelitian menunjukkan adanya potensi ekstrak daun bungur dalam menurunkan kadar glukosa darah penderita DM. Ekstrak daun bungur dari beberapa pelarut diketahui memiliki aktivitas hipoglikemik baik secara *in vivo* maupun *in vitro* (Mishra *et al.* 1990; Kakuda *et al.* 1996; Liu *et al.* 2001; Hayashi *et al.* 2002), sedangkan penelitian yang mengkaji tentang efek daun bungur terhadap metabolisme lemak pada DM belum pernah dilakukan.

Pemberian ekstrak daun bungur diharapkan menjadi salah satu bentuk terapi DM komprehensif yang mencakup dua aspek yaitu, hipoglikemik dan hipolipidemik. Sebelum diaplikasikan secara klinis pada manusia, diperlukan rangkaian penelitian dalam skala laboratorium, baik secara *in vivo* maupun *in vitro*. Penelitian tentang aktivitas hipoglikemik daun bungur telah dilakukan dan ditemukan kelompok senyawa aktifnya meskipun secara detail masih belum jelas (Liu *et al.*, 2001), sedangkan penelitian tentang aktivitas hipolipidemik dari daun bungur belum pernah dilakukan. Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui aktivitas hipoglikemik dan hipolipidemik ekstrak air daun bungur (*Lagerstroemia speciosa* [L.] Pers.) pada tikus diabetik.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan tempat

Penelitian dilaksanakan di Unit Pengembangan Hewan Percobaan (UPHP) UGM Yogyakarta dan Sub Lab. Biologi Laboratorium Pusat MIPA UNS Surakarta pada bulan Juli-Agustus 2003.

Bahan dan alat

Hewan percobaan yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus* L.) jantan strain Wistar dengan umur 2-3 bulan dan berat tubuh 150-180 gram sebanyak 18 tikus. Hewan percobaan diperoleh dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan, Universitas Gajah Mada, Yogyakarta.

Bahan tumbuhan untuk penelitian ini adalah daun bungur (*Lagerstroemia speciosa* [L.] Pers.) yang diperoleh dari kampus UNS Surakarta. Daun yang akan diekstrak dipilih yang sudah tua. Untuk mengekstrak digunakan pelarut akuades. Reagen Folin-Ciocalteu, reagen Butanol-HCl, reagen Ferric, HCl pekat, H₂SO₄ 2 N, NaNO₂ 1%, Na₂CO₃, pyridine, dan asam tanat adalah kimia untuk studi fitokimia. Larutan CMC (*carboxymethylcellulose*) 1% digunakan untuk sebagai pelarut glibenclamid (obat diabetes kimiawi sintetis). Alloskan monohidrat digunakan untuk menginduksi tikus normal menjadi diabetes.

Bahan-bahan yang digunakan dalam analisis kadar glukosa dan lemak adalah enzim glukosa oksidase, untuk analisis glukosa; kolesterol esterase dan kolesterol oksidase untuk analisis kolesterol; lipoprotein lipase, gliserokinase, gliserol-3-fosfat-oksidas, dan peroksidase untuk analisis trigliserida. Semua reagen untuk analisis glukosa dan lemak didapatkan dari *DiaSys Diagnostic Systems GmbH & Co.KG*. Jerman.

Alat-alat yang digunakan untuk pembuatan ekstrak daun bungur adalah timbangan analitik, pisau, corong, blender, gelas beker, oven, desikator, *rotary evaporator*, dan penangas air. Pengambilan sampel darah dilakukan dengan kapiler hematokrit. Analisis kadar glukosa dan lemak darah menggunakan tabung effendorf, *sentrifuge*, mikropipet, dan seperangkat alat spektrofotometri, serta tabung kuvet.

Cara kerja

Rancangan percobaan

Penelitian ini menggunakan rancangan percobaan berupa Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 6 perlakuan, masing-masing tiga ulangan.

Pembuatan ekstrak

Daun bungur yang masih segar dibersihkan dari kotoran dan dicuci dengan akuades, kemudian dikering-anginkan selama satu malam, kemudian dimasukkan dalam oven pada suhu 37⁰-40⁰ C, selama 3 hari. Setelah kering, daun dipotong-potong kecil dan dihaluskan dengan blender. Proses ekstraksi dilakukan berdasarkan metode Liu *et al.* (2001) yang dimodifikasi. Bubuk daun bungur diekstrak dengan akuades mendidih selama 30 menit. Ekstraksi dilakukan dengan perbandingan 50 gram bubuk daun bungur dalam 1 liter akuades. Untuk mendapatkan ekstrak yang kering maka dilakukan pemekatan dengan *rotary evaporator*. Proses pemekatan ini dilakukan sampai diperoleh ekstrak lembek, kemudian dikeringkan dalam desikator. Ekstrak kering yang diperoleh kemudian digunakan untuk perlakuan.

Pembuatan larutan perlakuan

Ekstrak daun bungur dibuat larutan perlakuan dengan 3 variasi dosis menurut Mishra *et al.* (1990), yaitu 0,1 g/200 g BB, 0,2 g/200 g BB, dan 0,5 g/200 g BB. Larutan perlakuan dibuat dengan menggunakan larutan CMC 1% sebagai pelarut ekstrak. Larutan CMC 1% dibuat dengan melarutkan CMC 1 gram dalam akuades hingga mengembang dan dihaluskan sampai homogen. Setelah itu, ditambahkan akuades hingga volume total 100 ml. Dosis glibenclamid yang dianjurkan pada tikus putih adalah 0,126 mg/200 g BB (hasil perhitungan konversi dosis untuk manusia). Suspensi glibenclamid dibuat dengan melarutkan 0,126 mg dalam 1 ml larutan CMC 1%.

Perlakuan pada hewan percobaan

Hewan percobaan diadaptasikan terlebih dahulu selama tujuh hari untuk membiasakan dengan kondisi laboratorium dan persiapan terhadap

perlakuan selanjutnya. Perlakuan yang diberikan terhadap hewan uji terdiri atas kontrol, perlakuan alloksan, perlakuan ekstrak air daun bungur, serta perlakuan glibenclamid (Tabel 1.). Setiap kelompok perlakuan terdiri dari 3 ekor tikus.

Tabel 1. Kelompok perlakuan.

No.	Kel.	Perlakuan
1.	I	Kontrol ; non-alloksan
2.	II	non-perlakuan ekstrak
3.	III	alloksan/ ekstrak 0,1 g/200 g BB
4.	IV	diabetik ekstrak 0,2 g/200 g BB
5.	V	ekstrak 0,5 g/200 g BB
6.	VI	glibenclamid 0,126 mg/200 g BB

Perlakuan alloksan

Perlakuan dengan alloksan diberikan pada hewan uji untuk mendapatkan tikus diabetik. Dosis alloksan yang diberikan adalah 20 mg/200 gr BB tikus (Mishra *et al.*, 1990). Larutan alloksan monohidrat dilarutkan dalam akuades dan diberikan melalui subcutan dengan menggunakan alat suntik (*syringe*) sebanyak 0,5 ml. Akibat pemberian alloksan akan mulai terlihat setelah 48 jam.

Perlakuan ekstrak air daun bungur

Perlakuan dengan ekstrak air daun bungur dilakukan 3 hari setelah perlakuan alloksan. Sebelum perlakuan ekstrak, hewan uji dipuasakan selama 6 jam dengan tetap diberi air secara *ad libitum*. Selanjutnya, ekstrak daun bungur diberikan secara oral dengan menggunakan alat suntik yang ujung jarumnya telah dimodifikasi menjadi jarum kanul.

Perlakuan glibenclamid

Perlakuan glibenclamid diberikan sebagai pembanding efek penurunan kadar glukosa darah tikus oleh ekstrak air daun bungur. Pemberian glibenclamid dilakukan 3 hari setelah perlakuan alloksan. Suspensi glibenclamid diberikan per oral dengan jarum kanul sebanyak 1 ml.

Pengukuran aktivitas hipoglikemik dan hipolipidemik

Pada penelitian ini, parameter aktivitas hipoglikemik yang diambil adalah kadar glukosa darah, sedangkan parameter untuk hipolipidemik adalah kadar trigliserida dan kolesterol darah. Pengamatan glukosa, trigliserida, dan kolesterol darah dilakukan sebanyak 4 kali, yaitu jam ke-0 (sebelum perlakuan), jam ke-2, jam ke-4, dan jam ke-6 (setelah perlakuan).

Pengambilan sampel darah dilakukan dengan menggunakan kapiler mikrohematokrit melalui sinus orbitalis. Darah ditampung dalam tabung effendorf kemudian disentrifuge pada 5000 rpm selama 30 menit. Serum darah yang diperoleh, dianalisis kadar glukosa, kolesterol, dan trigliseridanya menggunakan teknik *enzimatic colorimetric-photometric test*, yaitu metode GOD-PAP untuk glukosa (DiaSys, 2000a), metode CHOD-PAP untuk kolesterol (DiaSys, 2000b), dan metode GPO untuk trigliserida (DiaSys, 2000c).

Analisis data

Aktivitas hipoglikemik dinyatakan dengan persentase penurunan kadar glukosa, sedangkan aktivitas hipolipidemik dinyatakan dengan persentase penurunan kadar kolesterol dan trigliserida. Data kadar glukosa, trigliserida, dan kolesterol dianalisis dengan menggunakan ANOVA (*Analysis of Variance*) dan dilanjutkan dengan uji DMRT (*Duncan's Multiple Range Test*) pada taraf signifikansi 5%. Data studi fitokimia dianalisis secara deskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Terapi oral anti-diabetik (OAD) ditujukan untuk memperbaiki metabolisme tubuh penderita diabetes. Target minimal yang harus dicapai dalam terapi OAD adalah perbaikan metabolisme glukosa dengan penurunan kadar glukosa dalam darah. Namun, sekarang telah dikembangkan terapi yang lebih komprehensif, yang mampu memperbaiki metabolisme glukosa, sekaligus lemak dan badan keton (Tjokroprawiro, 2000).

Pemberian ekstrak air daun bungur (EADB) pada penelitian ini termasuk dalam pengembangan terapi OAD. Ekstrak tersebut diperoleh dari daun bungur yang kering. Daun bungur yang tua dipilih untuk mendapatkan kandungan senyawa yang relatif tinggi dibandingkan dengan daun muda. Waktu yang dibutuhkan untuk mengeringkan daun bungur kurang lebih 3 hari. Dalam proses pengeringan tersebut, berat daun akan turun sampai 90% dari berat awal. Pengurangan berat tersebut disebabkan kandungan air menguap dari dalam jaringan daun.

Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan air panas sebagai pelarut ekstrak, supaya kandungan fenol, terutama tanin dalam daun bungur dapat terekstrak. Senyawa tersebut memiliki sifat mudah larut dalam pelarut polar atau semi-polar. Suhu pelarut yang panas (di atas 90°C) dapat meningkatkan ekstraktibilitas senyawa yang terkandung dalam daun. Dari 500 gram daun bungur kering yang diekstrak akan diperoleh 25 gram EADB.

Pada penelitian ini tikus putih jantan strain Wistar (150–180 g) normal memiliki kadar glukosa darah 96,03 mg/dl; kolesterol 75,41 mg/dl; dan trigliserida 147,28 mg/dl. Untuk membuat diabetik digunakan larutan alloksan monohidrat (100 mg/kg BB). Alloksan mampu menyebabkan tikus normal menjadi hiperglikemia karena senyawa tersebut memiliki sifat sitotoksik spesifik pada sel beta pankreas. Dalam tubuh tikus, alloksan akan membangkitkan gugus radikal yang menyebabkan rusaknya sel beta. Molekul alloksan bereaksi dengan gugus -SH dan -tiol, terutama dalam reaksi oksidasi glutathione-peptida yang banyak sekali terdapat di dalam sel beta. Dalam reaksi tersebut akan dibebaskan senyawa peroksida, super-oksida, dan hidroksil radikal, yang semuanya bersifat sangat toksik (McLetchie, 2002).

Kerusakan sel beta akan diikuti dengan turunnya sekresi hormon insulin. Berkurangnya jumlah

insulin, menyebabkan reaksi glikogenesis dan transport glukosa ke dalam sel menjadi berkurang. Sebaliknya reaksi glikogenolisis menjadi tak terkendali, sehingga tikus menjadi hiperglikemia. Jadi, efek diabetogenik dari alloksan identik dengan penyakit IDDM (diabetes mellitus-tergantung insulin) atau DM-tipe 1 (Saravanan dan Pari, 2003). Pada penelitian ini, 72 jam setelah perlakuan alloksan, tikus menjadi diabetik dengan kadar glukosa darah rata-rata 156,92 mg/dl. Kondisi hiperglikemik tersebut, tergolong dalam diabetes ringan (*mild diabetes*). Selain itu, tikus juga mengalami kondisi hiperlipidemik dengan kadar trigliserida 152,42 mg/dl dan kolesterol 92,41 mg/dl. Pada kondisi tersebut, pemberian perlakuan EADB dan glibenclamid mulai dilakukan.

Aktivitas hipoglikemik

Aktivitas hipoglikemik suatu agen anti-diabetik dalam terapi OAD dinyatakan dalam bentuk penurunan kadar glukosa darah dalam jangka waktu tertentu. Rata-rata kadar glukosa tikus setelah perlakuan EADB dapat dilihat pada Tabel 2. Kadar glukosa darah tikus dihitung 4 kali pada interval waktu setiap 2 jam, dimulai dari jam ke-0 sampai jam ke-6. Hal ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui efek jangka pendek perlakuan terhadap kadar glukosa darah tikus. Informasi mengenai efek jangka pendek tersebut dapat digunakan untuk memperjelas mekanisme aktivitas hipoglikemik EADB.

Hasil perhitungan ANOVA dan DMRT 5% (Tabel 2.) menunjukkan bahwa, pada saat sebelum perlakuan (0 jam), kadar glukosa darah tikus normal (rata-rata 96,03 mg/dl) berbeda nyata ($p < 0,05$) dengan kelompok tikus diabetik (rata-rata 156,92 mg/dl). Sampai 6 jam setelah perlakuan, kadar glukosa darah kelompok tikus normal tetap berbeda nyata ($p > 0,05$) dengan kelompok tikus diabetik. Ini menunjukkan bahwa perlakuan EADB dan glibenclamid tidak mampu membuat kadar glukosa darah tikus diabetik menjadi normal dalam waktu 6 jam. Kemungkinan, jika perlakuan EADB dan glibenclamid diberikan lebih dari sekali, maka kadar glukosa darah tikus dapat menjadi normal,

seperti yang ditunjukkan oleh Mishra *et al.* (1990).

Perlakuan EADB dan glibenclamid mulai menunjukkan aktivitas hipoglikemik pada 2 jam sampai 6 jam setelah perlakuan. Seluruh kelompok perlakuan EADB (kecuali dosis 0,1 g/200 g BB) dan glibenclamid menunjukkan penurunan yang berbeda nyata ($p > 0,05$) dengan kelompok kontrol diabetik. Aktivitas hipoglikemik EADB tertinggi ditunjukkan pada dosis 0,5 g/200 g BB (20,43%). Pada dosis tersebut, EADB menunjukkan aktivitas hipoglikemik yang sama atau tidak berbeda nyata dengan kelompok perlakuan glibenclamid (20,88%). Perlakuan EADB dosis 0,1 g/200 g BB tidak menunjukkan aktivitas hipoglikemik (3,81%) yang berbeda nyata dibandingkan dengan kelompok kontrol diabetik (2,45%). Sedangkan perlakuan EADB dosis 0,2 g/200 g BB menunjukkan aktivitas hipoglikemik (7,87%) yang berbeda nyata ($p > 0,05$) dengan kontrol diabetik, namun masih lebih rendah dibandingkan dengan kelompok glibenclamid.

Kemampuan EADB dalam menurunkan kadar glukosa darah tikus diabetik berkaitan dengan aktivitas biologis senyawa yang terkandung di dalam daun bungur. Mishra *et al.* (1990) menyebutkan bahwa senyawa aktif yang dapat menurunkan kadar glukosa darah tikus kemungkinan ada tiga kelompok yaitu, alkaloid, saponin, atau flavonoid. Liu *et al.* (2001) berhasil menunjukkan secara *in vitro* bahwa senyawa aktif daun bungur mampu meningkatkan kecepatan transport glukosa, namun belum diketahui senyawanya. Hal ini kemudian dibuktikan oleh Hayashi *et al.* (2002) dengan mengisolasi senyawa aktif tersebut. Setelah diteliti, ternyata diketahui senyawa aktif dalam daun bungur tidak termasuk dalam ketiga kelompok senyawa di atas, namun masuk dalam kelompok polifenol, yaitu ellagitannin.

Ellagitannin tersebut, yaitu lagerstroemin, flosin B, dan reginin A memiliki sifat yang mirip dengan hormon insulin (*insulin-like compound*). Secara *in vitro*, tiga senyawa tersebut mampu meningkatkan aktivitas transport glukosa ke dalam sel adiposa. Kemampuan lagerstroemin dan flosin B hampir setengah kali kemampuan insulin dalam meningkatkan kecepatan transport glukosa. Bahkan, reginin A memiliki kemampuan yang hampir sama dengan insulin (Hayashi *et al.*, 2002).

Dari uraian tersebut, dapat diketahui bahwa aktivitas hipoglikemik EADB terjadi melalui peningkatan kecepatan transport glukosa. Peningkatan kecepatan transport tersebut terjadi melalui jalur yang sama dengan jalur kerja hormon insulin. Hal ini didasarkan pada penelitian yang menunjukkan bahwa kerja ellagitannin dari daun bungur ternyata dapat dihambat oleh senyawa wortmannin (Hayashi *et al.*, 2002). Wortmannin itu sendiri merupakan senyawa yang menutup jalur kerja hormon insulin. Wortmannin mampu menghambat aktivasi PI 3-kinase

Tabel 2. Kadar glukosa darah tikus pada waktu 0, 2, 4, dan 6 jam setelah perlakuan dan persentase penurunannya

Kelompok perlakuan	Kadar glukosa darah (mg/dl)				Persentase penurunan
	0 jam	2 jam	4 jam	6 jam	
Kontrol normal	96.03 ^a	94.05 ^a	92.26 ^a	90.48 ^a	5,76% ^{ab}
Kontrol diabetik	157.64 ^b	158.43 ^d	155.85 ^d	153.77 ^d	2,45% ^a
Glibenclamid	154.86 ^b	149.80 ^b	143.45 ^b	122.52 ^b	20,88% ^c
Ekstrak 0.1 g/200 g BB	156.15 ^b	153.37 ^c	152.78 ^{cd}	150.20 ^{cd}	3,81% ^a
Ekstrak 0.2 g/200 g BB	158.93 ^b	154.46 ^c	150.10 ^c	146.43 ^c	7,87% ^b
Ekstrak 0.5 g/200 g BB	157.04 ^b	149.51 ^b	140.48 ^b	124.90 ^b	20,43% ^c
Nilai p (ANOVA)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

Keterangan: angka yang diikuti huruf superscript yang sama dalam satu kolom menunjukkan antar perlakuan tidak beda nyata ($p > 0,05$).

(*phosphatidylinositol 3-kinase*), yang merupakan salah satu tahapan dalam jalur kerja hormon insulin (Standaert *et al.*, 1996; Svitkin *et al.*, 1998). Mekanisme molekuler EADB dalam menurunkan kadar glukosa darah tikus diilustrasikan dalam Gambar 5.

Dalam sistem pencernaan, senyawa dalam EADB diserap dan masuk ke dalam sistem sirkulasi darah kemudian disebarkan ke seluruh jaringan tubuh. Setelah mencapai sel target, misalnya sel adiposa, senyawa aktif dalam EADB berikatan dengan protein IR (*insulin receptor*) yang merupakan reseptor spesifik untuk hormon insulin (Roith dan Zick, 2001). Ikatan tersebut menyebabkan autofosforilasi-aktivasi *Tyr kinase* yang terletak pada bagian intraselluler reseptor dan diikuti dengan fosforilasi *Tyr residue*. Reaksi tersebut menyebabkan aktivasi IRS (*insulin receptor substrate*), sehingga membangkitkan *docking site* dari molekul *SH2-containing protein*, yaitu protein subunit p85/p110 pada PI 3-kinase. Aktivasi ini dapat dihambat oleh wortmannin (Roith dan Zick, 2001; Standaert *et al.*, 1996). Dengan aktifnya *docking site* protein subunit p85/p110, maka molekul PI 3-kinase menjadi aktif dan menghasilkan PIP_3 (*phosphatidylinositol 3,4,5-phosphate*) (Roith dan Zick, 2001). PIP_3 berikatan dengan PH-domain (*plekstrin homology-domain*) dari PDK-1 (*PIP₃-dependent kinase-1*) dan Akt (*protein Ser/Thr kinase B*). Reaksi ini menyebabkan PDK-1 dan Akt menjadi aktif (Roith dan Zick, 2001). Aktifnya molekul Akt, menyebabkan translokasi protein

GLUT4. Protein inilah yang menjadi perantara dalam mekanisme tranport glukosa (Roith dan Zick, 2001; Bauman dan Saltiel, 2001; Standaert *et al.*, 1996).

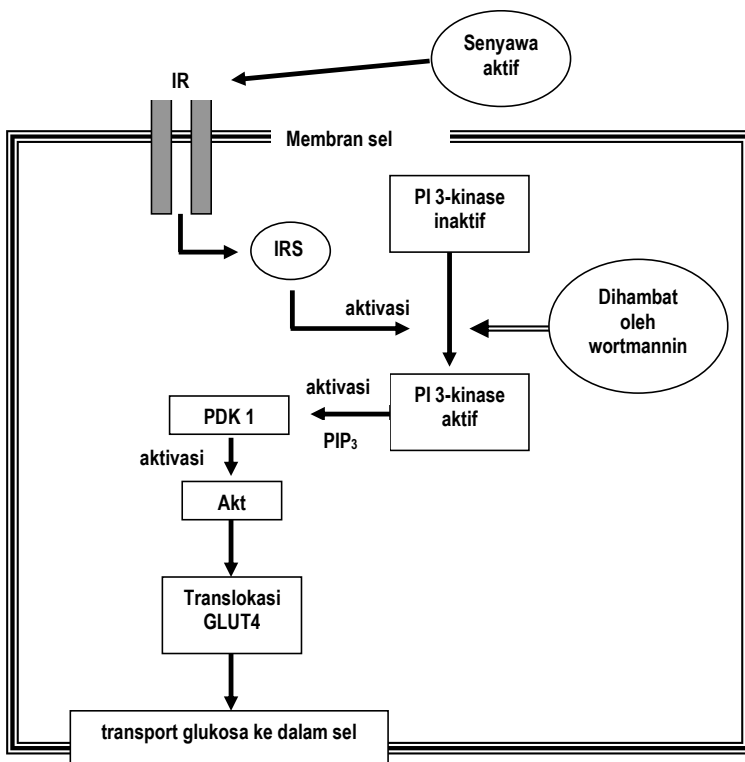
Secara umum, terapi OAD (baik tradisional maupun modern) memiliki mekanisme aktivitas hipoglikemik EADB, sebagai berikut:

Meningkatkan glikogenesis. Tanaman anti-diabetik yang dapat meningkatkan glikogenesis adalah *Momordica charantia* (McWhorter, 2001). Dari uraian mekanisme molekuler senyawa aktif EADB sebelumnya (Gambar 5), dapat diperkirakan bahwa EADB juga meningkatkan glikogenesis melalui aktivasi enzim glikogen sintesis. Aktivasi protein Akt oleh senyawa aktif EADB (Gambar 5) tidak hanya menimbulkan efek molekuler translokasi protein GLUT4 saja, tetapi juga menyebabkan fosforilasi molekul GSK-3 (*glycogen synthase kinase-3*), sehingga enzim glikogen sintase menjadi aktif (Roith dan Zick, 2001). Dengan aktifnya glikogen sintase, maka proses glikogenesis dapat berlangsung. Untuk membuktikan mekanisme ini, perlu dilakukan penelitian yang mengukur aktivitas enzim glikogen sintase setelah perlakuan EADB. Kemungkinan mekanisme ini juga didasarkan pada penelitian Hosoyama *et al.* (2003) yang menunjukkan bahwa di dalam daun bungur terdapat senyawa yang dapat menghambat aktivitas enzim α -amilase. Pemecahan glikogen (glikogenolisis) membutuhkan kelompok enzim amilo- α -glukosidase, yang tergolong dalam kelompok α -amilase. Penghambatan enzim tersebut dapat menghambat reaksi glikogenolisis (McKee dan McKee, 1999).

Menghambat aktivitas enzim aldose reduktase.

Kandungan asam elagat dalam tanaman anti-diabetik, *Phyllanthus niruri*, dapat menghambat aktivitas enzim aldose reduktase (Shimizu *et al.*, 1989; Taylor, 2003). Enzim ini berperan dalam metabolisme glukosa jalur poliol (pembentukan sorbitol dan fruktosa dari glukosa). Pada DM jalur ini mengalami kecenderungan menuju ke reaksi pembentukan glukosa. Untuk itu, enzim aldose reduktase harus dihambat (Trueblood dan Ramsay, 1998). Terdapat kemungkinan EADB memiliki mekanisme yang sama. Hal ini didasarkan atas kandungan senyawa yang sama, yaitu asam elagat, yang dapat dihasilkan dari hidrolisis ellagitannin dalam daun bungur (Gross, 1992).

Merangsang sekresi hormon insulin oleh sel beta. Beberapa tanaman obat memiliki mekanisme aktivitas hipoglikemik dengan merangsang sekresi hormon insulin oleh sel beta pankreas, contohnya ragi *Saccaromyces sp* (Edens *et al.*, 2001), *Phelinus linteus* (Kim *et al.*, 2001), *Allium sativum* (Zhang *et al.*, 2001a), *Gymnema sylvestra*, *Panax ginseng*, dan *Eleutherococcus senticosus* (McWhorter, 2001). Namun bukti yang jelas mengenai mekanisme tersebut pada EADB belum



Gambar 5. Mekanisme molekuler senyawa aktif daun bungur dalam meningkatkan transport glukosa (Roith dan Zick, 2001; Bauman dan Saltiel, 2001; Standaert *et al.*, 1996).

ada. Meski demikian, tidak tertutup kemungkinan EADB mampu merangsang sel beta untuk meningkatkan sekresi hormon insulin. Untuk membuktikan mekanisme tersebut, perlu dilakukan pengamatan mikroskopis sel beta pankreas dan pengukuran kadar hormon insulin pada interval waktu tertentu, setelah perlakuan EADB.

Meningkatkan afinitas hormon insulin terhadap reseptornya. *Ciglitazon* adalah OAD yang mampu meningkatkan afinitas dan sensitivitas hormon insulin terhadap reseptornya (Tjokroprawiro, 2000). Mengenai mekanisme ini, Liu *et al.* (2001) membuktikan dengan mengkombinasikan perlakuan ekstrak daun bungur dengan hormon insulin. Hasil penelitiannya menunjukkan bahwa ada ataupun tidak ada hormon insulin, ekstrak daun bungur tetap mampu meningkatkan kecepatan transport glukosa. Ini menunjukkan bahwa tidak ada hubungan yang sinergis ataupun antagonis antara hormon insulin dengan ekstrak daun bungur. Padahal, jika dugaan ekstrak daun bungur memiliki mekanisme yang sama dengan *Ciglitazon*, maka seharusnya perlakuan kombinasi hormon insulin dengan ekstrak daun bungur memberikan hasil yang positif dan perlakuan ekstrak daun bungur saja memberikan hasil yang negatif. Hasil yang tidak sesuai dengan dugaan tersebut, menunjukkan bahwa ekstrak daun bungur tidak memiliki aktivitas hipoglikemik dengan meningkatkan afinitas dan jumlah reseptor hormon insulin.

Meningkatkan ekspresi gen PPAR γ . Gen PPAR γ (*peroxisome proliferator-activated receptor- γ*) adalah faktor gen yang mengatur ekspresi protein transporter GLUT4 dan merangsang adipogenesis. Ekspresi gen ini dapat ditingkatkan oleh obat anti-diabetik *thiazolidinediones* (TZD). Efek hipoglikemik TZD merupakan efek jangka panjang (munculnya lambat) (Liu *et al.* 2001). Berbeda dengan efek hipoglikemik EADB, yang dalam penelitian ini menunjukkan efek jangka pendek perlakuan, muncul 2 jam setelah perlakuan. EADB, justru menghambat ekspresi PPAR γ , ditunjukkan dengan proses adipogenesis yang terhambat. Dengan fakta ini, diperkirakan bahwa EADB tidak memiliki mekanisme hipoglikemik dengan melalui ekspresi gen PPAR γ .

Meningkatkan aktivitas enzim heksokinase. *Cassia auriculata* adalah tanaman obat anti-diabetik yang dapat meningkatkan aktivitas enzim heksokinase. Enzim ini berperan dalam penggunaan glukosa (*glucose utilization*), dengan mengubah glukosa menjadi glukosa-fosfat dalam proses glikogenesis (McKee dan McKee, 1999). Mekanisme ini belum dibuktikan pada EADB, sehingga perlu penelitian yang mengukur kadar enzim heksokinase setelah perlakuan EADB.

Aktivitas hipolipidemic

Aktivitas hipolipidemic merupakan proses penurunan kadar lemak dalam darah. Parameter yang digunakan untuk mengukur aktivitas tersebut adalah penurunan kadar kolesterol total dan trigliserida dalam darah. Pengaruh pemberian glibenclamid dan EADB terhadap kadar kolesterol

dan trigliserida darah tikus diabetik dapat dilihat pada Tabel 3. dan 4.

Hasil perhitungan ANOVA dan DMRT 5% pada Tabel 2. di atas menunjukkan bahwa tikus diabetik memiliki kadar kolesterol total yang lebih tinggi daripada tikus normal. Kondisi diabetik dapat menyebabkan ketidakseimbangan metabolisme lemak. Aktivitas lipolisis yang tinggi akan menghasilkan asam lemak yang tinggi pula. Proses glukoneogenesis yang meningkat sebagai respon terhadap kondisi sel yang kekurangan energi menyebabkan akumulasi badan keton dalam darah. Kandungan asam lemak dan badan keton yang meningkat dapat merangsang sintesis kolesterol. Hormon insulin yang mengalami penurunan fungsi menyebabkan aktivitas enzim lipoprotein lipase juga menurun. Akibatnya, pemecahan lipoprotein darah juga menurun. Padahal kolesterol dan trigliserida disirkulasikan darah dalam bentuk lipoprotein. Itulah sebabnya, kandungan lipoprotein yang tinggi pada penderita DM selalu diikuti dengan naiknya kadar kolesterol dan trigliserida (Tabel 4.).

Hasil perhitungan ANOVA dan DMRT 5% (Tabel 4.) menunjukkan bahwa pada saat sebelum perlakuan (0 jam) trigliserida darah tikus diabetik mengalami peningkatan dan berbeda nyata ($p > 0,05$) jika dibandingkan dengan tikus normal. Hal ini menunjukkan bahwa kondisi diabetik atau hiperglikemik memicu abnormalitas metabolisme lemak, yang ditunjukkan dengan kondisi hipertrigliseridemia. Pada kondisi diabetik, aktivitas mobilisasi lemak dan lipolisis dalam tubuh meningkat. Kadar gliserol hasil lipolisis yang meningkat, akan merangsang sintesis trigliserida. Cadangan lemak di jaringan adiposa harus dikeluarkan dan disebarkan ke seluruh jaringan melalui sistem peredaran darah. Akibatnya, selain kolesterol, kadar trigliserida dalam darah pun juga mengalami peningkatan.

Aktivitas hipolipidemic EADB untuk kolesterol tertinggi ditunjukkan pada dosis 0,5 g/200 g BB (Tabel 3.). Pada dosis tersebut, kadar kolesterol darah dapat turun sampai 18,98%, sedangkan trigliserida turun 10,30% (Tabel 4.). Variasi dosis EADB ternyata tidak memberikan perbedaan aktivitas hipolipidemic yang berbeda nyata pada kadar trigliserida darah. Ini dapat dilihat pada persentase penurunan kadar trigliserida pada masing-masing dosis yang ternyata masih dalam satu *range*.

Perlakuan glibenclamid tidak menunjukkan adanya aktivitas hipolipidemic yang berbeda nyata jika dibandingkan dengan kelompok kontrol diabetik dan kontrol normal. Hal ini sesuai dengan karakteristik efek metabolik glibenclamid yang bersifat tidak mempengaruhi metabolisme lemak penderita DM. Tjokroprawiro (2000) menyebutkan bahwa terapi OAD golongan sulfonilurea, termasuk glibenclamid, tidak memberikan perbaikan pada metabolisme lemak.

Mekanisme kerja EADB dalam menurunkan kadar lemak, secara detail (seperti pada aktivitas hipoglikemik), belum diketahui dan penelitian yang khusus mengkaji mengenai hal tersebut belum

Tabel 3. Kadar kolesterol darah tikus pada waktu 0, 2, 4, dan 6 jam setelah perlakuan dan persentase penurunannya.

Kelompok perlakuan	Kadar kolesterol (mg/dl)				Persentase penurunan
	0 jam	2 jam	4 jam	6 jam	
Kontrol normal	75.41 ^a	73.39 ^a	72.77 ^a	73.23 ^a	2,90% ^a
Kontrol diabetik	95.04 ^c	94.28 ^d	92.78 ^e	92.53 ^c	2,64% ^a
Glibenclamid	91,63 ^b	89,43 ^c	86,56 ^d	86,25 ^b	5,87% ^a
Ekstrak 0.1 g/200 g BB	91.93 ^b	83.85 ^b	81.25 ^c	80.47 ^b	12,45% ^b
Ekstrak 0.2 g/200 g BB	91.30 ^b	83.09 ^b	77.98 ^b	76.09 ^a	16,64% ^{bc}
Ekstrak 0.5 g/200 g BB	92.14 ^b	82.16 ^b	76.88 ^b	74.65 ^a	18,98% ^c
Nilai p (ANOVA)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

Keterangan: angka yang diikuti huruf *superscript* yang sama dalam satu kolom menunjukkan antar perlakuan tidak beda nyata ($p>0,05$).

Tabel 4. Kadar trigliserida darah tikus pada waktu 0, 2, 4, dan 6 jam setelah perlakuan dan persentase penurunannya.

Kelompok perlakuan	Kadar trigliserida (mg/dl)				Persentase penurunan
	0 jam	2 jam	4 jam	6 jam	
Kontrol normal	147.28 ^a	146.47 ^{bc}	144.48 ^b	143.79 ^b	2,36% ^a
Kontrol diabetik	156.50 ^c	154.02 ^d	150.57 ^c	148.02 ^c	5,39% ^b
Glibenclamid	152.16 ^b	149.80 ^c	146.91 ^{bc}	144.47 ^b	5,05% ^{ab}
Ekstrak 0.1 g/200 g BB	151.05 ^b	141.64 ^a	138.69 ^a	134.89 ^a	10,68% ^c
Ekstrak 0.2 g/200 g BB	151.02 ^b	142.69 ^{ab}	138.24 ^a	136.45 ^a	9,64% ^c
Ekstrak 0.5 g/200 g BB	151.38 ^b	141.91 ^a	139.47 ^a	135.79 ^a	10,30% ^c
Nilai p (ANOVA)	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000

Keterangan: angka yang diikuti huruf *superscript* yang sama dalam satu kolom menunjukkan antar perlakuan tidak beda nyata ($p>0,05$).

pernah dilakukan. Namun diperkirakan bahwa mekanisme molekuler aktivitas hipolipidemik EADB mengikuti jalur kerja hormon insulin. Perkiraan tersebut didasarkan atas uraian mekanisme molekuler pada mekanisme peningkatan transport glukosa (Gambar 5). Selain berpengaruh pada metabolisme glukosa, aktivasi protein Akt oleh EADB memiliki efek metabolik lain, yaitu pada metabolisme lemak (Roith dan Zick, 2001; Wang dan Sul, 1998). Liu *et al.* (2001) menunjukkan bahwa, ekstrak daun bungur mampu menghambat ekspresi gen PPAR γ . Gen ini bertanggungjawab pada stimulasi adipogenesis dan biosintesis lemak di dalam sel adiposa (Kersten, 2001). Penghambatan ekspresi gen tersebut secara langsung dapat menurunkan kadar lemak dalam darah dan menghambat diferensiasi jaringan adiposa.

Beberapa kemungkinan mekanisme molekuler yang perlu dibuktikan melalui penelitian lanjut adalah sebagai berikut:

Pengaktifan enzim lipoprotein-lipase. Pada kondisi diabetik, aktivitas enzim lipoprotein lipase (enzim pemecah lipoprotein) sehingga kadar lipoprotein dalam darah meningkat (Hadley, 2000). Dengan pengaktifan kembali enzim tersebut, maka aktivitas pemecahan lipoprotein meningkat dan akan terjadi penurunan kadar lipoprotein.

Pengaturan kondisi redoks sel dengan NADPH. Biosintesis lemak membutuhkan sejumlah besar molekul NADPH. Sebagian besar molekul NADPH untuk biosintesis tersebut diperoleh dari jalur pentosa fosfat. Enzim yang berperan adalah glukosa-6-fosfat dehidrogenase (GPDH). Sebagian kecil NADPH juga dihasilkan dari metabolisme sitrat yang dikatalisis oleh enzim malat (*malic enzyme*) (McKee dan McKee, 1999). Peningkatan aktivitas dua enzim tersebut dapat menciptakan kesetimbangan redoks sel yang mendukung pada reaksi penggunaan lemak (*lipid utilization*) sehingga dapat mengembalikan metabolisme lemak pada kondisi normal. Contoh ramuan anti-diabetik tradisional yang mempunyai mekanisme seperti ini adalah Cogent db, dari India (Saravanan dan Pari, 2003). Ramuan anti-diabetik, ekstrak bunga *Cassia auriculata*, juga dapat mengatur kondisi redoks sel, namun melalui enzim glukosa-6-fosfatase.

Peningkatan ekspresi gen SREBP 1c di hati. Homeostasis lemak sangat dipengaruhi oleh ekspresi gen SREBP 1c (*sterol-regulatory-element binding protein 1c*) di hati. Gen ini bertanggungjawab dalam mengatur

aktivitas enzim-enzim yang berperan dalam metabolisme lemak (Ferre *et al.*, 2001). Ekspresi gen ini dimediasi oleh reseptor LXRs (*Liver x receptors*) (Tobin *et al.*, 2002). Jika senyawa aktif EADB dapat membentuk kompleks dengan reseptor LXR, maka dapat dipastikan ekspresi gen SREBP 1c dapat diaktifkan. Namun, kemungkinan mekanisme ini belum dibuktikan.

Penghambatan biosintesis kolesterol. Biosintesis kolesterol terjadi melalui tiga tahapan utama yaitu pembentukan HMG-CoA (hydroxymethylglutaryl-CoA) dari asetil-CoA, konversi HMG-CoA menjadi skualene, dan pembentukan kolesterol dari skualene (McKee dan McKee, 1999). Biosintesis kolesterol dapat dihambat dengan menurunkan aktivitas enzim-enzim yang berperan dalam tiga tahapan biosintesis tersebut. Beberapa senyawa organo-sulfur dalam umbi bawang putih dapat menurunkan aktivitas enzim-enzim dalam biosintesis kolesterol (Pizzorno dan Murray, 2000; Gupta dan Porter, 2001).

KESIMPULAN

Ekstrak air daun bungur menunjukkan aktivitas hipoglikemik pada dosis 0,2 g/200 g BB dan 0,5 g/200 g BB. Pada dosis 0,5 g/200 g BB, EADB menunjukkan aktivitas hipoglikemik yang tidak berbeda nyata dengan kelompok perlakuan glibenclamid. Aktivitas hipoglikemik tersebut terjadi melalui mekanisme yang mengikuti jalur kerja hormon insulin. Ekstrak air daun bungur menunjukkan aktivitas hipolipidemik pada semua dosis perlakuan yaitu, 0,1 g/200 g BB; 0,2 g/200 g BB dan 0,5 g/200 g BB. Semua dosis perlakuan EADB menunjukkan aktivitas hipolipidemik yang lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan glibenclamid. Aktivitas hipolipidemik tersebut diperkirakan terjadi melalui mekanisme yang mengikuti jalur kerja hormon insulin. Ekstrak air daun bungur memiliki kandungan fenol total 0,0255%; ellagitannin 0,011%; gallotanin 0,0199%; dan tanin-terkondensasi 0,0167% berat ekstrak.

DAFTAR PUSTAKA

- Baumann, C.A and A.R. Saltiel. 2001. Spatial compartmentalization of signal transduction in insulin action. *BioEssays* 23: 215-222.
- Budhi, M. 1994. Tahap-tahap pengembangan obat tradisional. *Majalah Kedokteran Udayana* 5: 107-113.
- Dewi, A.D., Marsono, dan Z. Noor. 2001. Efek hipoglikemik diet protein kedelai dan asam fitat pada tikus diabetes. *AGROSAIANS* 14 (1): 111-120.
- DiaSys. 2000a. *Diagnostic Reagent for Qantitative In Vitro Determination of Glucose in Serum or Plasma on Photometric System*. Holzhheim: DiaSys Diagnostic Systems GmbH & Co. KG. Jerman.
- DiaSys. 2000b. *Diagnostic Reagent for Qantitative In Vitro Determination of Cholesterol in Serum or Plasma on Photometric System*. Holzhheim: DiaSys Diagnostic Systems GmbH & Co. KG. Jerman.
- DiaSys. 2000c. *Diagnostic Reagent for Qantitative In Vitro Determination of Triglycerides in Serum or Plasma on Photometric System*. Holzhheim: DiaSys Diagnostic Systems GmbH & Co. KG. Jerman.
- Edens, N.K., L.A. Reaves, M.S. Bergana, I.L. Reyzer, P. O'Mara, J.H. Baxter, and M.K. Snowden. 2001. Yeast extract stimulates glucose metabolism and inhibits lipolysis in rat adipocytes in vitro. *Journal of Nutrition* 132: 1141-1148.
- Ferre, P., M. Foretz, D. Azzout-Marniche, D. Becard, and P. Foufelle. 2001. Sterol-regulatory-element-binding protein 1c mediates insulin action on hepatic gene expression. *Biochemical Society Transactions*. 29 (4): 547- 552.
- Gross, G.G. 1992. Enzymes in the biosynthesis of hydrolyzable tannins. In Hemingway, R.W. dan P.E. Laks (eds.). *Plant Polyphenols: Synthesis, Properties, and Significance*. New York: Plenum Press.
- Gupta, N. and T.D. Porter. 2001. Garlic and garlic-derived compounds inhibit human squalene monooxygenase. *Journal of Nutrition* 13: 1662-1667.
- Hadley, M.I., 2000. *Endocrinology*. Edisi ke-5. USA: Prentice Hall International, Inc.
- Hayashi, T., H. Maruyama, R. Kasai. K. Hattori, S. Takasuga, O. Hazeki, K. Yamasaki, and T. Tanaka. 2002. Ellagitannins from *Lagerstroemia speciosa* as activators of glucose transport in fat cells. *Planta Medica* 68: 173-175.
- Hosoyama, H., A. Sugimoto, Y. Suzuki, I. Sakane, and T. Kakuda. 2003. Isolation and quantitative analysis of the α -amylase inhibitor in *Lagerstroemia speciosa* (L.). Pers. (Banaba). *Yakugaku Zasshi* 123 (7): 599-605.
- Kahn, B.B. and J.S. Flier. 2000. Obesity and insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation* 106 (4): 473-481.
- Kakuda, T., I. Sakane, T. Takihara, Y. Ozaki, H. Takeuchi, and M. Kuroyanagi. 1996. Hypoglycemic effect of extracts from *Lagerstroemia speciosa* L. leaves in genetically diabetic KK-Ay mice. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 60 (2): 204-208.
- Kersten, S. 2001. Mechanism of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis: review. *EMBO Reports* 2 (4): 282-286.
- Khan, M.T.H., L. Lampronti, D. Martello, N. Bianchi, S. Jabbar, M.S.K. Choudhuri, B.K. Datta, and R. Gambari. 2002. Identification of pyrogallol as an antiproliferative compound present in extracts from the medicinal plant *Emblica medicinalis*: effect on in-vitro cell growth of human tumor cell lines. *International Journal of Oncology* 20: 187-192.
- Lee, K.H., H.K. Wang, H. Itokawa, and S.L. Morris-Natschke. 2000. Current perspectives on chinese medicines and dietary supplements in China, Japan and the United States. *Journal of Food and Drug Analysis* 8 (4): 219-228.
- Liu, F., J. Kim, Y. Li, X. Liu, J. Li, and X. Chen. 2001. An extracts of *Lagerstroemia speciosa* L. has insulin-like glucose uptake-stimulatory and adipocyte differentiation-inhibitory activities in 3T3-L1 cells. *Journal of Nutrition* 131: 2242-2247.
- Maher, J.T. 2000. Alpha-lipoic acid and co-Q10 in diabetes mellitus. *Natural Healing Track*. Juli: 2-7.
- Marieb, E.N. 1997. *Human Anatomy and Physiology*. Edisi ke-4. USA: Benjamin/Cummings Science Publishing.
- McKee, T. and J.R. McKee. 1999. *Biochemistry: An Introduction*. 2nd ed. USA: The McGraw-Hill Companies, Inc.
- McLetchie, N.G.B. 2002. Alloxan diabetes: a discovery, albeit a minor one. *Journal of Review Coll and Physicians Edinburgh* 32: 134-142.
- McWhorter, L.S. 2001. Biological complementary therapies: a focus on botanical products in diabetes. *Diabetes Spectrum* 14 (4): 199-208.
- Mishra, Y., M.S.Y. Khan, R. Zafar, and S.S. Agarwal. 1990. Hypoglycaemic activity of leaves of *Lagerstroemia speciosa* L. Pers. *Indian Journal of Pharmacology* 22: 174-176.
- Pizzorno, J.E. and M.T. Murray. 2000. *A Textbook of Natural Medicine: Allium sativum*. Edisi ke-2. Washington: Bastyr University.
- Roith, D. L. and Y. Zick. 2001. Recent advances in our understanding of insulin action and insulin resistance. *Diabetes Care* 24 (3): 588-596.
- Saravanan, G. and L. Pari. 2003. Effect of cogent db, a herbal drug, on serum and tissue lipid metabolism in experimental hyperglycaemic rats. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 5: 156-162.
- Shimizu, M., S. Horie, S. Terashima, H. Ueno, T. Hayashi, S. Suzuki, M. Yoshizaki, and N. Morita. 1989. Studies on aldose reductase inhibitors from natural products. II. Active components of a Paraguayan crude drug "parai-parai", *Phyllanthus niruri*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 37 (9): 2531-2532.
- Standaert, M.L., A. Avignon, K.Yamada, G. Bandyopadhyay, and R.V. Farese. 1996. The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, wortmannin, inhibits insulin induced activation of phosphatidylcholine hydrolysis

- and associated protein kinase C translocation in rat adipocytes. *Biochemical Journal* 313: 1039-1046.
- Svitkin, Y.V., H. Hahn, A. C. Gingras, A.C. Palmenberg, and N. Sonenberg. 1998. Rapamycin and wortmannin enhance replication of a defective encephalomyocarditis virus. *Journal of Virology* 72 (7): 5811-5819.
- Taylor, L. 2003. *Herbal Secrets of the Rainforest*. Edisi ke-2. Austin: Sage Press, Inc.
- Tjokroprawiro, A. 2000. *Diabetes Mellitus: Klasifikasi, Diagnosis, dan Terapi*. Edisi ke-3. Jakarta: PT. Gramedia Pustaka Utama.
- Tobin, K.A.R., S.M. Ulven, G.U. Schuster, H.H. Steineger, S.M. Andressen, J.A. Gustafsson, and H.I. Nebb. 2002. Liver X receptors as insulin-mediating factors in fatty acid and cholesterol biosynthesis. *The Journal Biological Chemistry* 277 (12): 10691-10697.
- Trueblood, N. and R. Ramasamy. 1998. Aldose reductase inhibition improves altered glucose metabolism of isolated diabetic rat hearts. *American Physiological Society* 175-183.
- Wang, D. and H.S. Sul. 1998. Insulin stimulation of the fatty acid synthase promoter is mediated by the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *The Journal of Biological Chemistry* 273 (39): 25420-25426.
- Zhang, X.H., D. Lowe, P. Giles, S. Fell, M. J. Connock, and D. J. Maslin. 2001a. Gender may affect the action of garlic oil on plasma cholesterol and glucose levels of normal subjects. *Journal of Nutrition* 131: 1471-1478.

Seleksi dan Identifikasi Isolat Cendawan Selulolitik dan Ligno-selulolitik dari Limbah Penyulingan Daun Kayu Putih (*Melaleuca leucadendron* L.) dari KPH Gundih, Kabupaten Grobogan

Selection and identification of cellulolytic and lignocellulolytic fungi from organic waste of cajuput oil (*Melaleuca leucadendron* L.) from KPH Gundih, Regency of Grobogan

BASTIYAH DEWI ZUMROTININGRUM, ARI SUSILOWATI*, WIRYANTO

Jurusan Biologi FMIPA Universitas Sebelas Maret Surakarta 57126.

* Korespondensi: Jl. Ir. Sutami 36A Surakarta 57126. Tel. & Fax.: +62-271-663375. e-mail: cheetos@mipa.uns.ac.id.

Diterima: 4 Nopember 2003. Disetujui: 5 Desember 2003.

Abstract. The aims of this research were isolating and selecting fungi that degrading cellulose and lignocellulose of organic waste from cajuput oil distillation. The research outline is organic waste from cajuput oil distillation contain cellulose and lignocellulose that cause naturally composting process takes a long time. The difficulty of organic waste decomposition depends on the matters in the tissue. To speed up decomposition process it needs microorganism. Fungi have more ability to degrade cellulose and lignocellulose than bacteria. Because of that it was necessary to isolate and select fungi that able to degrade cellulose and lignocellulose of organic waste from cajuput oil distillation. This research was done by isolating and identifying fungi from organic waste from cajuput oil distillation and soil where organic waste from cajuput oil distillation was throw away. The selection cellulolytic fungi by inoculating fungi on CMC agar medium and to select lignocellulolytic fungi by inoculating soil dilution 10^{-4} to agar medium, which was added to organic waste from cajuput oil distillation. The result showed that total of 6 fungi was isolated from organic waste from cajuput oil distillation and soil where organic waste from cajuput oil distillation was throw away. *Aspergillus parasiticus*, *A. nidulans*, and *Trichoderma harzianum* have ability to degrade cellulose. Fungi that have ability to degrade lignocellulose of organic waste from cajuput oil distillation is *A. parasiticus*. *A. parasiticus* more potential degrade cellulose and lignocellulose organic waste from cajuput oil distillation than other fungi that found.

Keywords: cellulolytic and lignocellulolytic fungi, organic waste, cajuput oil distillation.

PENDAHULUAN

Kesatuan Pemangku Hutan (KPH) Gundih menanam kayu putih (*Melaleuca leucadendron* L.) sejak tahun 1964. Hal ini dilaksanakan mengingat luasnya tanah kosong bekas tegakan kayu jati yang rusak karena pencurian kayu, kebakaran maupun pengembalaan. Penanaman kayu putih tersebut dilakukan dengan pertimbangan bahwa kayu putih merupakan salah satu komoditi yang dapat diandalkan karena dari proses penyulingan daunnya dapat dihasilkan minyak kayu putih. Hingga saat ini luas areal tanaman kayu putih mencapai 3.167,6 Ha (Sukardjo, 2001).

Produksi biomassa daun kayu putih di KPH Gundih, Dusun Krai, Desa Bandungharja, Kecamatan Toroh, Kabupaten Grobogan, Jawa Tengah setiap tahunnya mencapai 8.000 ton lebih. Dari hasil penyulingan daun kayu putih tersebut setiap tahunnya dihasilkan limbah organik daun kayu putih $\pm$ 8.000 ton, dari jumlah tersebut hanya sekitar 50% yang digunakan untuk briket bahan bakar ketel uap dalam proses penyulingan daun kayu putih. Hal ini berarti

masih sisa sebanyak 50% limbah yang tidak digunakan dan bila dibiarkan akan membutuhkan lahan yang cukup luas untuk membuangnya serta dapat menimbulkan kebakaran karena limbah daun kayu putih tersebut mudah terbakar. Limbah yang melimpah tersebut belum dimanfaatkan dan hanya dibiarkan terakumulasi di lahan sekitar pabrik penyulingan kayu putih (Sukardjo, 2001).

Pengomposan limbah organik daun kayu putih secara alami membutuhkan waktu yang lama dan menghasilkan CO₂ dalam tanah sehingga mengganggu pertumbuhan tanaman juga pencemaran udara walaupun relatif rendah (Murbando, 1999). Lama dekomposisi limbah tersebut secara alami kurang lebih 3 tahun dikarenakan sifat daun yang sangat sulit hancur (Anonim, 2000). Mudah dan sukarnya dekomposisi suatu seresah tergantung dari zat-zat yang terkandung di dalam jaringannya (Ambarwati, 2001). Adanya lignoselulosa pada dinding sel sekunder tanaman menyebabkan lamanya waktu dekomposisi (Beguín dan Aubert, 1992; Fengel dan Wegener, 1995). Menurut Sutedjo dkk., (1991) bahan

lignoselulosa tersebut secara alami sulit terdegradasi sehingga untuk mempercepat proses pengomposan diperlukan mikrobia yang mampu mendegradasinya. Pada umumnya selulosa dapat didegradasi oleh *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fomes*, *Fusarium*, *Myrothecium*, *Penicillium*, *Polyporus*, *Rhizopus*, dan *Verticillium*. Adapun genus *Aspergillus*, *Fusarium*, dan *Penicillium* dapat menggunakan lignin yang berasal dari gandum jerami (Alexander, 1977).

Limbah penyulingan daun kayu putih sukar terdekomposisi. Adanya lignoselulosa pada dinding sel sekunder tanaman menyebabkan lamanya waktu degradasi. Sehingga untuk mempercepat proses tersebut diperlukan mikrobia yang mampu mendegradasinya. Cendawan memiliki kemampuan yang lebih besar daripada bakteri dalam mendegradasi selulosa dan lignoselulosa, maka dengan alasan tersebut perlu dilakukan diisolasi dan diseleksi cendawan dari limbah penyulingan daun kayu putih dan tanah dari tempat pembuangan limbah penyulingan daun kayu putih.

Tujuan Penelitian adalah untuk mengetahui (i) jenis cendawan yang mampu tumbuh pada limbah daun kayu putih dan tanah dari tempat pembuangan limbah penyulingan daun kayu putih KPH Gundih Kabupaten Grobogan, (ii) Isolat cendawan yang berpotensi mendegradasi selulosa dan lignoselulosa limbah penyulingan daun kayu putih, (iii) jenis cendawan yang paling berpotensi dalam mendegradasi selulosa dan lignoselulosa limbah daun kayu putih.

BAHAN DAN METODE

Bahan dan alat

Bahan berupa limbah penyulingan daun kayu putih, tanah dari tempat pembuangan limbah penyulingan daun kayu putih, PDA (*Potato Dextrose Agar*), streptomisin, klortetrasiklin, MEA (*Malt Extract Agar*), agar, CMC (*Carboxymethyl Cellulosa*), K_2HPO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, NH_4Cl , larutan Iodium, akuades, kapas, spirtus, kertas saring. Alat yang digunakan adalah jarum inokulasi, cawan petri, gelas benda, gelas penutup, gelas beker, bunsen, autoklaf, inkubator, mikroskop, tabung reaksi, timbangan analitik, vortex, stirer, dan spatula.

Cara kerja

Isolasi cendawan

Untuk memperoleh jumlah isolat sebanyak mungkin ditempuh tiga metode isolasi yaitu: *direct transfer*, *moist chamber* dan *direct plating*.

Metode direct transfer. Cendawan yang terdapat pada limbah penyulingan daun kayu putih diambil dengan menggunakan jarum inokulasi steril. Kemudian cendawan tersebut diinokulasikan dalam medium PDA dengan penambahan streptomisin (30 mg/L) dan klortetrasiklin (2

mg/L) kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 72 jam. Setiap 24 jam cendawan yang tumbuh pada medium PDA diisolasi dan kemudian dikulturmurnikan. Isolat cendawan yang diperoleh dipelihara pada medium PDA miring (Malloch, 1940; Haigler dan Paul, 1991).

Metode moist chamber. Gelas beker diisi dengan kapas dan ditambah air. Penambahan air dilakukan sampai dengan seperempat tinggi gelas beker. Kertas saring diletakkan di atas kapas sehingga spesimen tidak berhubungan langsung dengan kapas. Limbah penyulingan daun kayu putih diletakkan di atas kertas saring. Kemudian wadah ditutup dan diinkubasi pada suhu kamar sampai cendawan tumbuh pada seresah daun kayu putih. Dengan menggunakan jarum inokulasi steril, cendawan yang terdapat pada limbah daun kayu putih dipindahkan ke medium PDA dengan penambahan streptomisin (30 mg/L) dan klortetrasiklin (2 mg/L) kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 72 jam. setiap 24 jam cendawan yang tumbuh pada medium PDA diisolasi dan kemudian dikulturmurnikan. Isolat cendawan yang diperoleh dipelihara pada medium PDA miring (Malloch, 1940; Haigler dan Paul, 1991).

Metode direct plating. Limbah penyulingan daun kayu putih dan tanah dari tempat pembuangan limbah penyulingan daun kayu putih diletakkan pada medium PDA dengan penambahan streptomisin (30 mg/L) dan klortetrasiklin (2 mg/L) kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 72 jam. setiap 24 jam cendawan yang tumbuh pada medium PDA diisolasi dan kemudian dikulturmurnikan. Isolat cendawan yang diperoleh dipelihara pada medium PDA miring (Malloch, 1940; Haigler dan Paul, 1991).

Identifikasi cendawan

Identifikasi cendawan dilakukan dengan mengamati ciri-ciri koloni dan morfologi cendawan. Pengamatan ciri-ciri koloni cendawan dengan cara menumbuhkan Isolat cendawan pada medium MEA, sedangkan untuk pengamatan morfologi cendawan dilakukan dengan menggunakan metode *Henrich's slide culture*. Selanjutnya spesies cendawan dideterminasi.

Seleksi cendawan. Setelah diisolasi, cendawan diseleksi antara cendawan selulolitik dan lignoselulolitik.

Seleksi cendawan selulolitik. Masing-masing Isolat cendawan diinokulasikan pada medium CMC agar. Kemudian cendawan diinkubasi pada suhu kamar selama 72 jam. Pada akhir inkubasi permukaan medium ditetesi larutan I_2KI . Apabila cendawan tersebut mempunyai kemampuan selulolitik, maka akan terlihat zona jernih di sekitar koloni Isolat cendawan tersebut. Selanjutnya setiap koloni cendawan diukur diameter koloni dan diameter zona jernihnya (Aaronson, 1970; Griffin, 1981; Haigler dan Paul, 1991).

Seleksi cendawan lignoselulolitik. Tanah diencerkan dengan akuades hingga 10^{-4} . Kemudian hasil pengenceran tanah diambil 1 ml lalu diinokulasikan pada medium agar dengan penambahan limbah penyulingan daun kayu putih. Setelah itu medium diinkubasi pada suhu kamar hingga tumbuh cendawan yang koloninya mampu membentuk zona jernih. Kemampuan lignoselulolitik cendawan didasarkan pada pembentukan zona jernih. Kemudian koloni cendawan yang membentuk zona jernih tersebut dikulturmurnikan. Isolat cendawan yang diperoleh dipelihara pada medium PDA miring. Identifikasi cendawan dilakukan dengan mengamati ciri-ciri koloni dan morfologi cendawan. Pengamatan ciri-ciri koloni cendawan dengan cara menumbuhkan Isolat cendawan pada medium MEA, sedangkan untuk pengamatan morfologi cendawan dilakukan dengan menggunakan metode *Henrich's slide culture*. Selanjutnya spesies cendawan dideterminasi menggunakan *Compendium of Soil Fungi* (Domsch *et al.*, 1980) dan *Pengenalan Kapang Tropik Umum* (Gandjar dkk., 1999).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Jenis cendawan

Isolasi dari limbah penyulingan daun kayu putih menghasilkan 3 jenis Isolat cendawan dan isolasi dari tanah dari tempat pembuangan limbah penyulingan daun kayu putih menghasilkan 4 jenis Isolat cendawan (Tabel 1).

Tabel 1. Isolat cendawan dari isolasi limbah penyulingan daun kayu putih dan tanah dari tempat pembuangan limbah penyulingan daun kayu putih.

Isolat cendawan	Sumber	
	Daun kayu putih	Tanah
1	•	✓
2	✓	•
3	•	✓
4	✓	✓
5	•	✓
6	✓	•

Keterangan: ✓ = hadir; • = tidak hadir.

Isolat cendawan 4 dapat ditemukan dari isolasi limbah penyulingan daun kayu putih dan dari isolasi tanah dari tempat pembuangan limbah penyulingan daun kayu putih. Jumlah keseluruhan Isolat cendawan yang diperoleh sebanyak 6 Isolat cendawan yang berbeda. Adapun keenam Isolat cendawan tersebut adalah sebagai berikut:

Isolat cendawan 1

Isolat cendawan 1 diidentifikasi sebagai *Aspergillus niger*, dengan ciri-ciri: koloni pada

medium MEA mencapai diameter 3,5 cm dalam waktu 3 hari, terdiri dari lapisan basal berwarna putih dan suatu lapisan konidiofor yang berwarna hitam. Vesikel berbentuk bulat hingga semibulat dan berdiameter 50-100 μm . Fialid terbentuk pada metula dan berukuran $(7,0-9,5) \times (3-4) \mu\text{m}$. Konidia berwarna hitam, berbentuk bulat hingga semibulat, berukuran 3,5-5,0 μm . Berdasarkan ciri-ciri di atas Isolat cendawan 1 merupakan spesies (Gandjar, dkk., 1999).

Isolat cendawan 2

Isolat cendawan 2 diidentifikasi sebagai *Aspergillus oryzae*, dengan ciri-ciri: koloni pada medium MEA mencapai diameter 4,5 cm dalam waktu 3 hari, terdiri dari lapisan basal berwarna putih dan suatu lapisan konidiofor yang berwarna coklat tua. Konidiofor berwarna jernih. Vesikel berbentuk semibulat dan berdiameter 40-80 μm . Fialid terbentuk pada metula dan berukuran $(10-15) \times (3-5) \mu\text{m}$. Metula berukuran $(8-12) \times (4-5) \mu\text{m}$. Konidia berwarna coklat redup, bentuk bulat, berdiameter 4,5-8,0 μm (Gandjar, dkk., 1999).

Isolat cendawan 3

Isolat cendawan 3 diidentifikasi sebagai *Aspergillus parasiticus*, dengan ciri-ciri: koloni pada medium MEA mencapai diameter 4 cm dalam waktu 3 hari, terdiri dari lapisan basal berwarna putih dan suatu lapisan konidiofor yang berwarna kuning. Konidiofor berwarna jernih dan kasar. Vesikel berbentuk bulat hingga semibulat, dan berdiameter 25 sampai 45 μm . Fialid terbentuk langsung pada vesikel dan berukuran $(6-10) \times (4,0-5,5) \mu\text{m}$. Konidia berwarna kuning, berbentuk bulat hingga semibulat, berdiameter 3,6 μm (Klich dan Pitt, 1998).

Isolat cendawan 4

Isolat cendawan 4 diidentifikasi sebagai *Aspergillus nidulans*, dengan ciri-ciri: koloni pada medium MEA mencapai diameter 3,5 cm dalam waktu 3 hari. Lapisan konidiofor berwarna hijau dengan zona pertumbuhan berwarna putih. Konidiofor berwarna kecoklatan, mempunyai panjang 60-130 μm , dan berdinding halus. Vesikel kurang lebih berbentuk bulat dan berdiameter 8-10 μm . Konidia berwarna hijau kekuningan, berbentuk bulat, berdinding kasar dan berdiameter 3-3,5 μm (Gandjar, dkk., 1999).

Isolat cendawan 5

Isolat cendawan 5 diidentifikasi sebagai *Trichoderma harzianum*, dengan ciri-ciri: koloni pada medium MEA mencapai diameter 7,5 cm dalam waktu 3 hari, terdiri dari lapisan basal berwarna putih kehijauan dan suatu lapisan konidiofor yang berwarna hijau redup. Konidiofor dapat bercabang menyerupai piramida, yaitu pada bagian bawah cabang lateral yang berulang-ulang, sedangkan ke arah ujung percabangan menjadi bertambah pendek. Konidia berbentuk

semibulat hingga oval pendek, berukuran (2,8-3,2)x(2,5-2,8) μm dan berdinding halus (Gandjar, dkk., 1999).

Isolat cendawan 6

Isolat cendawan 6 diidentifikasi sebagai *Rhizopus oligoporus*, dengan ciri-ciri: koloni berwarna abu-abu kecoklatan dan konidiofor mencapai tinggi 1 mm. Pada medium MEA, dalam waktu 3 hari Isolat cendawan ini sudah memenuhi cawan petri. Sporangiofor dapat tunggal atau berkelompok, berwarna jernih hingga kecoklatan, muncul berlawanan arah dengan rhizoid yang sangat pendek, berdinding halus atau agak kasar, panjang hingga 1000 μm dan berdiameter 10-18 μm . Sporangia berbentuk bulat berwarna hitam kecoklatan pada saat matang dan berdiameter 100-180 μm . Spora berbentuk bulat, elips atau tidak teratur, memiliki panjang 7-24 μm , membentuk massa berwarna kecoklatan, bila tunggal berwarna jernih dan berdinding halus (Gandjar, dkk., 1999).

Isolat cendawan selulolitik

Berdasar nilai perbandingan antara zona jernih dan diameter yang dibentuk oleh masing-masing isolat cendawan, maka diperoleh 3 jenis Isolat cendawan yang dapat mendegradasi selulosa. Ketiga cendawan tersebut yaitu *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus nidulans* dan *Trichoderma harzianum*. Adapun nilai perbandingan antara diameter zona jernih dan diameter koloni dapat dilihat dalam Tabel 2.

Tabel 2. Perbandingan antara zona jernih dan diameter koloni.

Cendawan	Diameter Zona Jernih (cm)	Diameter Koloni (cm)	Nilai Perbandingan Diameter
<i>Aspergillus niger</i>	0,0	2,0	0,0000
<i>Aspergillus oryzae</i>	0,0	2,7	0,0000
<i>Aspergillus parasiticus</i>	3,8	3,0	1,2667
<i>Aspergillus nidulans</i>	3,3	2,9	1,1379
<i>Trichoderma harzianum</i>	7,6	7,5	1,0133
<i>Rhizopus oligoporus</i>	0,0	10	0,0000

Cendawan yang paling berpotensi mendegradasi selulosa adalah Isolat cendawan 3. Semakin besar nilai perbandingan diameter zona jernih dan diameter koloni, maka semakin berpotensi cendawan tersebut dalam mendegradasi selulosa (Kader dan Omar, 1998). Cendawan dapat mendegradasi selulosa karena cendawan dapat membentuk dan mensekresikan enzim selulase.

Semakin besar jumlah enzim selulase yang disekresikan oleh cendawan, semakin cepat degradasi selulosa (Bagga dan Sandhu, 1987; Soeka dan Sastroatmadja, 1992).

Cendawan lignoselulolitik

Sebagian besar cendawan yang mendegradasi lignin juga mendegradasi selulosa. Cendawan ini dikenal dengan cendawan lignoselulolitik. Dari seleksi cendawan yang berpotensi dalam mendegradasi senyawa lignoselulosa yang terdapat dalam limbah penyulingan daun kayu putih hanya diperoleh 1 jenis isolat cendawan. Hal ini dikarenakan tidak semua cendawan mampu mendegradasi lignin. Cendawan yang dapat mendegradasi lignin yaitu cendawan yang memiliki lignase (Alexander, 1977; Rothschild *et al.*, 1995). Isolat cendawan yang berpotensi mendegradasi lignoselulosa limbah penyulingan daun kayu putih tersebut, pada medium MEA mencapai diameter 4,5 cm dalam waktu 3 hari, terdiri dari lapisan basal berwarna putih dan suatu lapisan konidiofor yang berwarna kuning. Dari pengamatan mikroskopis menggunakan metode *Henrich's slide culture*. Isolat cendawan tersebut mempunyai ciri-ciri konidiofor berwarna jernih dan kasar. Vesikel berbentuk bulat hingga semibulat, dan berdiameter 25 sampai 45 μm . Fialid terbentuk langsung pada vesikel berukuran (6-10)x(4,0-5,5) μm . Konidia berwarna kuning, berbentuk bulat hingga semibulat, berdiameter 3,6 μm . Berdasarkan ciri di atas Isolat cendawan tersebut merupakan spesies *Aspergillus parasiticus* (Klich dan Pitt, 1998).

KESIMPULAN

Diperoleh 6 jenis Isolat cendawan yang tumbuh pada limbah daun kayu putih dan tanah di tempat pembuangan limbah penyulingan daun kayu putih, yaitu: *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *A. parasiticus*, *A. nidulans*, *Trichoderma harzianum* dan *Rhizopus oligoporus*. *Aspergillus parasiticus*, *A. nidulans* dan *Trichoderma harzianum* mampu mendegradasi selulosa dan *A. parasiticus* mampu mendegradasi lignoselulosa limbah daun kayu putih. Di antara Isolat cendawan yang diperoleh *A. parasiticus* paling berpotensi mendegradasi senyawa selulosa dan lignoselulosa limbah daun kayu putih.

DAFTAR PUSTAKA

- Aaronson, S. 1970. *Experimental Microbial Ecology*. New York: Academic Press.
- Alexander, M. 1977. *Introduction Soil Microbiology*. USA: John Wiley and Sons.
- Ambarwati. 2001. *Biodegradasi Limbah Padat Teh oleh Kultur Mikrobial dari Berbagai Sumber*. [Skripsi]. Yogyakarta: Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada.

- Anonim. 2000. *Sekilas Pengelolaan Hutan Kayu Putih di KPH Gundih*. Grobogan: Perum Perhutani Gundih.
- Bagga, P.S. and D.K. Sandhu. 1987. Cellulase formation by **Aspergillus nidulans**. *Journal of Fermentation Technology* 64: 118-126.
- Beguin, P. and J.P. Aubert. 1992. Cellulases. In: *Encyclopedia of Microbiology I*. New York: Academic Press.
- Domsch, K.H., W. Gams, and T.H. Anderson. 1980. *Compendium of Soil Fungi*. Volume 2. London: Academic Press.
- Fengel, D. dan G. Wegener. 1995. *Kayu: Kimia, Ultrastruktur, Reaksi-reaksi*. Penerjemah: Sastrohamidjojo, H. Yogyakarta: UGM Press.
- Gandjar, I., R.A. Samson, K.V.D. Tweel-Vermeulen, A. Oetari, dan I. Santoso. 1999. *Pengenalan Kapang Tropik Umum*. Jakarta: Yayasan Obor Indonesia.
- Griffin, D.H. 1981. *Fungal Physiology*. New York: John Wiley and Sons.
- Haigler, C.H. and J.P. Weiner. 1991. *Biosynthesis and Biodegradation of Cellulose*. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Kader, A.J. and O. Omar. 1998. Isolation of cellulolytic fungi from Sayap-Kinabalu Park, Sabah. *Article ASEAN Review of Biodiversity and Environmental Conservation (ARBEC)* 2: 1-5.
- Klich, M.A. and J.I. Pitt. 1988. *A Laboratory Guide to The Common Aspergillus Species and Their Telomorphs*. CSIRO. <http://www.aspergillus.man.ac.uk/secure/main.htm>
- Malloch, D. 1940. *Moulds: Their Isolation, Cultivation and Identification*. Toronto: University of Toronto Press.
- Murbandono, L.H.S. 1999. *Membuat Kompos*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Rothschild, N., Y. Hader, and C. Doretz, 1995. Lygnolitic System Formation by **Phanerochaeta chrysosporium** in Air. *Applied Environmental Microbiology* 61: 11-23.
- Soeka, Y.S. dan D.D. Sastroatmadja. 1992. *Penambahan Sumber-sumber Nitrogen terhadap Produksi Enzim Selulase oleh Aspergillus niger Terseleksi pada Medium Dedak*. Bogor: Pusat Penelitian dan Pengembangan Biologi LIPI. Prosiding Seminar Hasil Penelitian dan Pengembangan Sumberdaya Hayati 1991/1992.
- Sukardjo, J.S. 2001. *Pengkajian Daya Guna Limbah Organik Daun Kayu Putih KPH Gundih Sebagai Pupuk Organik*. [Tesis]. Surakarta: Program Studi Ilmu Lingkungan Program Pasca Sarjana UNS.
- Sutedjo, M.M., A.G. Kartasapoetra, dan R.D.S. Sastroadmodjo. 1991. *Mikrobiologi Tanah*. Jakarta: P.T. Rineka Cipta.

Optimasi Produksi Xilitol dengan Variasi Konsentrasi Hidrolisat Hemiselulosa Bagase oleh *Candida tropicalis*

Optimization xylitol production with variation of sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate concentration by Candida tropicalis

WAHYUNI, ARI SUSILOWATI*, RATNA SETYANINGSIH

Jurusan Biologi FMIPA Universitas Sebelas Maret Surakarta 57126.

* Korespondensi: Jl. Ir. Sutami 36A Surakarta 57126. Tel. & Fax.: +62-271-663375. e-mail: cheetos@mipa.uns.ac.id.

Diterima: 17 Agustus 2002. Disetujui: 28 Pebruari 2003.

Abstract. The aims of this research were to study the growth of *C. tropicalis*, the optimization of xylitol production and the efficiency of xylitol production by varying the concentration of sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate. The framework of this research was bioconversion xylose into xylitol by *C. tropicalis* influenced substrate concentration in production medium. By using different sugar cane bagasse hemicellulose hydrolysate concentration could be known the optimum sugar cane bagasse hemicellulose hydrolysate concentration on xylitol production by introducing *C. tropicalis*. The methods used in this experiment were as follow: sugarcane bagasse was hydrolyzed by H_2SO_4 0.035 M in autoclave at 121°C, 2 atm for 20 minutes. The liquid fraction was concentrated at 50°C using rotary evaporator. The hydrolysate was neutralized with $Ca(OH)_2$ to a pH of 10 and then removed by centrifugation at 2000 rpm for 20 minutes. The hydrolysate was added with H_2SO_4 to a pH 6.5 and then removed by centrifugation at 2000 rpm for 20 minutes and sterilized by autoclaving at 121°C for 15 minutes. Sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate concentration was varied from 10%, 20%, and 30% and used as substrate in production medium. Bioconversion process by *C. tropicalis* lasted for 4 days. Parameters used in this experiment were biomass of *C. tropicalis* measured by hemacytometer, xylose and xylitol concentration in the sugar cane bagasse hemicellulose hydrolysate and production medium were analyzed by High-Performance Liquid Chromatographic (HPLC). The results showed that: the growth of *C. tropicalis* lasted for 4 days of cultivation increased in every variation of sugar cane hemicellulose hydrolysate concentration. The optimum xylitol production founded in production medium contained 20% sugar cane bagasse hemicellulose hydrolysate in the third days cultivation with xylitol production 10.258 g/l, yield 0.22 g/g and biomass of *C. tropicalis* 2.9×10^8 cell/ml; The optimum efficiency of xylitol production from sugar cane bagasse hemicellulose hydrolysate by *C. tropicalis* was 24.21% in 20% sugar cane bagasse hemicellulose hydrolysate in the third days cultivation.

Keywords: optimation, xylitol, sugar cane bagasse, hemicellulose hydrolysate, *Candida tropicalis*.

PENDAHULUAN

Pemanis merupakan senyawa yang memiliki peranan penting dalam kehidupan manusia. Kehadiran pemanis ditujukan secara langsung untuk mencukupi kebutuhan manusia sehari-hari di samping penggunaannya yang luas dalam industri makanan sebagai bahan aditif. Manusia dengan segala upayanya terus mencari aneka jenis tanaman yang dapat dijadikan sumber pemanis, bahkan telah berhasil juga memproduksi pemanis substitusinya, berupa pemanis sintetis (Lutony, 1993).

Poliol merupakan karbohidrat tereduksi yang berpotensi digunakan sebagai pemanis pengganti sukrosa dalam industri makanan, ditemukan di alam dalam jumlah yang sedikit terutama pada buah-buahan dan sayuran (Dills, 1989). Polioli memiliki sifat-sifat khusus, yaitu memberikan rasa dingin dalam mulut (*cooling effect*) dan bersifat antikariogenik (Suryadi *et al.*, 2000). Xilitol merupakan polioli yang memiliki manfaat paling banyak dalam industri makanan, industri farmasi dan perawatan gigi berdasarkan sifat antikariogenik

dan kariostatiknya. Selain itu dapat pula digunakan sebagai pengganti gula bagi penderita diabetes dan penderita gangguan metabolisme lemak (Rodrigues *et al.*, 1998).

Penggunaan xilitol terbatas, karena metode konvensional yang digunakan dalam proses produksinya menyebabkan harga xilitol menjadi tinggi. Namun kebutuhan akan aplikasi xilitol pada industri makanan dan obat-obatan menyebabkan tingginya permintaan untuk memproduksi xilitol dengan harga yang lebih murah (Dominguez *et al.*, 1996). Dengan bioteknologi, proses produksi xilitol dapat dilakukan secara lebih efisien (Winkelhausen and Kuzmanova, 1998).

Xilosa merupakan pentosa yang dapat dihidrogenasi menjadi xilitol. Bagase merupakan sumber xilosa yang mengandung $\pm 30\%$ fraksi hemiselulosa yang dapat dihidrolisis menjadi xilitol oleh khamir (Felipe *et al.*, 1997). Khamir telah dibuktikan sebagai produser xilitol terbaik. Beberapa khamir yang telah teruji mampu memproduksi xilitol dari D-xylosa di antaranya adalah *Candida sp.*, *Debaryomyces hansenii*, *Hansenula anomala*, dan *Saccharomyces sp.*, (Winkelhausen and Kuzmanova, 1998)

Konsentrasi substrat merupakan faktor utama yang mempengaruhi pembentukan xilitol. Konsentrasi substrat yang optimum dibutuhkan untuk meningkatkan hasil xilosa dari hidrolisat hemiselulosa. Menurut Roberto *et al.* (1996a), komposisi medium, pH dan sumber nitrogen pada proses biokonversi dapat meningkatkan pertumbuhan mikroorganisme.

Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji pertumbuhan *C. tropicalis*, mengoptimasi produksi xilitol serta menghitung efisiensi produksi xilitol oleh *C. tropicalis* dengan variasi konsentrasi hidrolisat hemiselulosa bagase.

BAHAN DAN METODE

Alat dan bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi autoklaf, *rotary shaker*, *sentrifuge*, inkubator, oven, *rotary evaporator vakum*, pH meter, kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT), penyaring bakteri (mili-pore 0,2 μm), *colony counter*, ose, hemasitometer, lemari pendingin, peralatan gelas.

Mikroorganisme yang digunakan adalah *Candida tropicalis* FNCC 3033.

Berdasarkan penelitian Kusuma (2002), media yang digunakan terdiri dari: Media pemeliharaan *Yeast Pepton Dextrosa Agar* (YPDA) dengan komposisi: 0,5 g ekstrak khamir, 0,5 g pepton, 1,5 g glukosa, 1,5 g agar dan aquades ditambahkan sampai volume 100 ml; Media prekultuur dengan komposisi: 1,5 g ekstrak khamir, 2 g xilosa, 1 g glukosa, 0,2 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,01 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1 ml methanol dan aquades ditambahkan sampai volume 100 ml; Media produksi dengan komposisi: hidrolisat hemiselulosa bagase dengan konsentrasi 10%, 20% dan 30%, 1,2 g ekstrak khamir, 10 ml ure 1% (w/v), 1 ml methanol, 0,01 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dan aquades ditambahkan sampai volume 100 ml; Untuk analisis dengan alat kromatografi cair tekanan tinggi digunakan xilitol murni sebagai standar dan aquabidestilata sebagai eluen. H_2SO_4 0.035 M (E MERCK) dan $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (E MERCK) digunakan dalam hidrolisis hemiselulosa bagase.

Cara kerja

Hidrolisis hemiselulosa bagase

Hidrolisis hemiselulosa bagase berdasarkan metode yang dilakukan oleh Roberto *et al.* (1996b) sebagai berikut: Sebelum dihidrolisis, bagase dikeringkan terlebih dahulu di bawah sinar matahari kemudian dipotong kecil-kecil sepanjang ± 10 cm. Bagase tersebut kemudian dihidrolisis menggunakan H_2SO_4 0.035 M dengan perbandingan 1 g bagase dalam 6 ml H_2SO_4 . Hidrolisis dilakukan dalam autoklaf, suhu 121°C, tekanan 2 atm selama 20 menit. Fraksi cair diambil kemudian dipekatkan hingga $\pm \frac{1}{5}$ volume awal, dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50°C. Hidrolisat yang telah dipekatkan kemudian dinetralkan dengan menambahkan $\text{Ca}(\text{OH})_2$ hingga diperoleh pH 10. Setelah itu hidrolisat disentrifugasi dengan kecepatan 2000 rpm selama 20 menit, lalu

ditambah H_2SO_4 untuk menurunkan pH sampai 6,5. Hidrolisat yang telah dinetralisasi kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 2000 rpm selama 20 menit. Hidrolisat kemudian disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit untuk selanjutnya digunakan sebagai substrat dengan variasi konsentrasi 10%, 20% dan 30%. Pembuatan media produksi, hidrolisat hemiselulosa bagase kemudian ditambah dengan 1,2 g ekstrak khamir, 10 ml urea 1%, 1,0 ml methanol, 0,01 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dan aquadest hingga volumenya 100 ml.

Penyiapan inokulum (prekultur)

Penyiapan inokulum dilakukan dengan cara memindahkan biakan dari kultur kerja ke dalam Erlenmeyer 125 ml yang berisi 50 ml media prekultuur. Media prekultuur kemudian diinkubasi pada *rotary shaker* dengan kecepatan 200 rpm dan suhu 30°C selama 48 jam (Pfeifer *et al.*, 1996). Selanjutnya sel dipisahkan secara sentrifugasi dengan kecepatan 1600 rpm selama 10 menit, kemudian disuspensikan kembali dengan aquades steril, digunakan sebagai inokulum untuk media fermentasi. Sepuluh ml dari suspensi ini kemudian masing-masing diinokulasikan pada 100 ml media produksi dalam Erlenmeyer 250 ml lalu dihomogenkan dengan *rotary shaker* dengan kecepatan 200 putaran/menit selama 4 hari.

Pengambilan sampel

Pengamatan produksi xilitol dilakukan selama 4 hari dengan mengambil 4 ml dari tiap media produksi setiap harinya. Untuk pengamatan jumlah sel diambil 1,0 ml sampel kemudian setelah dilakukan pengenceran dihitung jumlah selnya dengan menggunakan hemasitometer. Sementara untuk pengamatan hasil produksi xilitol, 3,0 ml sampel disentrifugasi kemudian diambil supernatannya. Supernatan yang diperoleh kemudian disterilkan dengan menggunakan penyaring bakteri berdiameter 0,2 μm . Supernatan kemudian dianalisis konsentrasi xilosa dan xilitolnya dengan menggunakan alat kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) (Suryadi *et al.*, 2000).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hidrolisis hemiselulosa bagase

Hidrolisis hemiselulosa dari bagase menghasilkan hidrolisat hemiselulosa berwarna coklat tua dan berbau harum. Kandungan xilosa dalam hidrolisat hemiselulosa sebesar 49,7428 g/l, sedangkan kandungan xilitol dalam hidrolisat sebesar 3,795 g/l.

Jumlah sel *C. tropicalis*

Sebagai jumlah awal, *C. tropicalis* sebanyak 2×10^6 sel/ml diinokulasikan ke dalam media produksi yang mengandung hidrolisat hemiselulosa bagase, kemudian diinkubasi selama 4 hari. Selama 4 hari kultivasi, pertumbuhan *C. tropicalis* mengalami peningkatan pada masing-masing variasi konsen-

Tabel 1. Jumlah sel *C. tropicalis* pada berbagai variasi konsentrasi substrat hidrolisat hemiselulosa bagase selama 4 hari kultivasi.

Waktu kultivasi (hari)	Jumlah sel (sel/ml)		
	Konsentrasi substrat 10%	Konsentrasi substrat 20%	Konsentrasi substrat 30%
1	$0,4 \times 10^8$	$1,8 \times 10^8$	$2,1 \times 10^8$
2	$1,3 \times 10^8$	$2,7 \times 10^8$	$2,5 \times 10^8$
3	$2,0 \times 10^8$	$2,9 \times 10^8$	$3,0 \times 10^8$
4	$4,1 \times 10^8$	$3,4 \times 10^8$	$3,4 \times 10^8$

Tabel 2. Produksi xilitol dengan berbagai variasi konsentrasi substrat hidrolisat hemiselulosa bagase oleh *C. tropicalis* selama 4 hari kultivasi.

Konsentrasi substrat (%)	Waktu kultivasi (hari)	Konsentrasi xilosa (g/l)	Konsumsi xilosa (%)	Xilitol		
				(g/l)	Yield (g/g)	Efisiensi (%)
10	1	4,669	90,61	1,197	0,027	2,90
	2	4,652	90,65	4,065	0,090	9,80
	3	2,614	94,74	6,689	0,142	15,47
	4	0,874	98,24	1,181	0,024	2,64
20	1	9,739	80,42	1,364	0,034	3,72
	2	5,424	89,09	2,682	0,061	6,59
	3	3,533	92,89	10,258	0,220	24,21
	4	0,905	98,18	1,108	0,022	2,47
30	1	13,905	72,05	2,182	0,061	6,64
	2	12,806	74,25	3,659	0,099	0,11
	3	12,765	74,33	8,095	0,218	23,87
	4	11,816	76,24	2,443	0,064	7,02

trasi substrat hidrolisat hemiselulosa bagase, seperti tersaji pada Tabel 1.

Konsentrasi substrat hidrolisat hemiselulosa bagase yang berbeda menyebabkan perbedaan jumlah xilosa yang terdapat di dalam media. Kandungan xilosa dalam media produksi dalam jumlah yang cukup sangat penting karena xilosa merupakan aldopentosa dengan rumus $C_5H_{10}O_5$ sehingga memiliki fungsi sebagai sumber karbon yang berguna dalam metabolisme sel khamir yaitu dalam pembentukan energi dan pertumbuhan bagi sel khamir.

Pada konsentrasi substrat 10% jumlah sel menunjukkan hasil akhir yang lebih tinggi dibandingkan pada konsentrasi substrat 20% dan 30% yaitu sebesar $4,1 \times 10^8$ sel/ml. Perbedaan jumlah sel ini dikarenakan masing-masing konsentrasi memiliki perbedaan kandungan xilosa sebagai sumber nutrisi di dalam media produksi yang berguna untuk pertumbuhan sel khamir.

Pertumbuhan *C. tropicalis* tersebut sangat berpengaruh terhadap produksi xilitol karena produksi xilitol akan optimal hanya pada saat pertumbuhan sel berada dalam fase eksponensial. Pada fase ini pertumbuhan sel terjadi dengan cepat dan sangat dipengaruhi oleh media tempat tumbuhnya, seperti kandungan nutrisi dan kondisi lingkungan (Fardiaz, 1987).

Produksi xilitol

Proses biokonversi dilakukan dengan fermentasi menggunakan khamir *C. tropicalis* yang dapat menghasilkan enzim xilosa reduktase dan xilitol dehidrogenase yang keduanya dapat mengkatalis NADPH-dependen xilosa reduktase dan NADH-dependen xilitol dehidrogenase, sehingga dapat mengkonversi xilosa menjadi xilitol. Selain itu, *C. tropicalis* merupakan penghasil xilitol yang terbaik dibandingkan dengan khamir yang lain (Granstrom, 2002).

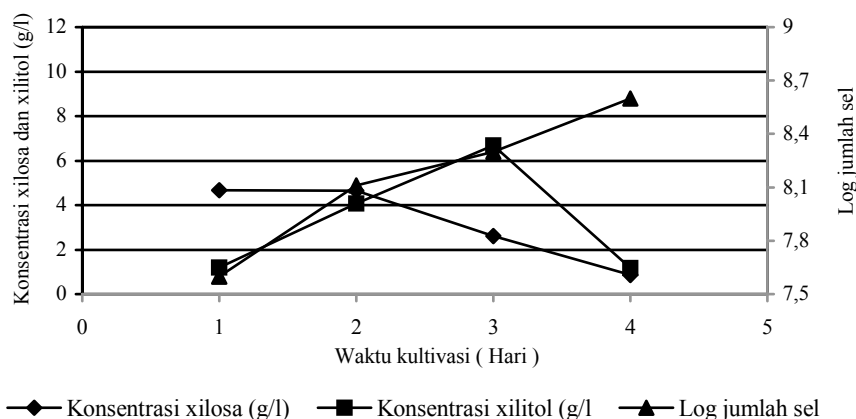
Konsentrasi xilosa dan xilitol diukur selama 4 hari kultivasi dengan menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi sehingga diperoleh konsentrasi xilosa dan xilitol pada berbagai variasi konsentrasi substrat hidrolisat hemiselulosa bagase oleh *C. tropicalis*. Berdasarkan perhitungan konsentrasi xilosa dan xilitol diperoleh besarnya konsumsi xilosa (%), produksi xilitol, *yield* (g/g) dan efisiensi produksi xilitol (%) yang dapat dilihat pada Tabel 2.

Setiap variasi konsentrasi substrat menunjukkan adanya penurunan dalam jumlah konsentrasi xilosa di dalam media produksi selama 4 hari kultivasi. Penurunan konsentrasi xilosa terjadi seiring dengan kenaikan jumlah konsumsi

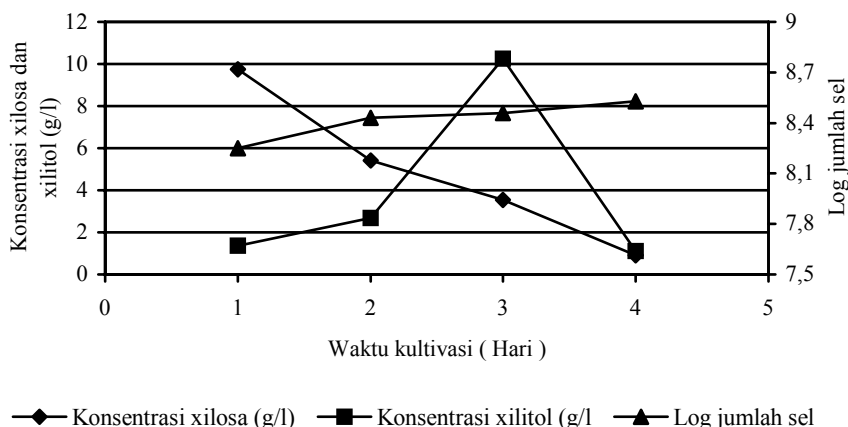
xilosa oleh sel *C. tropicalis* karena sel *C. tropicalis* memerlukan xilosa untuk pertumbuhannya di samping penggunaannya untuk memproduksi xilitol.

Pada konsentrasi substrat 10%, nilai *yield* terbesar yang diperoleh sebesar 0,142 g/g dengan produksi xilitol 6,689 g/l terjadi pada kultivasi hari ketiga. Pada kondisi ini jumlah xilosa yang terdapat di dalam media produksi sebesar 2,614 g/l dengan konsumsi xilosa sebesar 94,74%. Nilai *yield* pada konsentrasi ini lebih kecil dibandingkan konsentrasi substrat 20% dan 30% dikarenakan jumlah xilosa yang lebih sedikit. Jumlah xilosa yang ada dimanfaatkan khamir untuk metabolismenya yaitu untuk pertumbuhan dan produksi xilitol, terlihat dari persentase konsumsi xilosa yang lebih besar dibandingkan pada konsentrasi substrat 20% dan 30% pada hari ketiga kultivasi dan laju konsumsi xilosa yang rendah setiap hari kultivasi. Menurut Dominguez *et al.* (1996), konsumsi khamir yang besar terhadap xilosa pada kondisi ini terutama untuk memenuhi kebutuhannya akan sumber karbon dan hanya sebagian kecil xilosa yang dikonversi menjadi xilitol. Akibatnya produksi xilitol menjadi rendah sehingga menyebabkan nilai *yield* menjadi rendah pula.

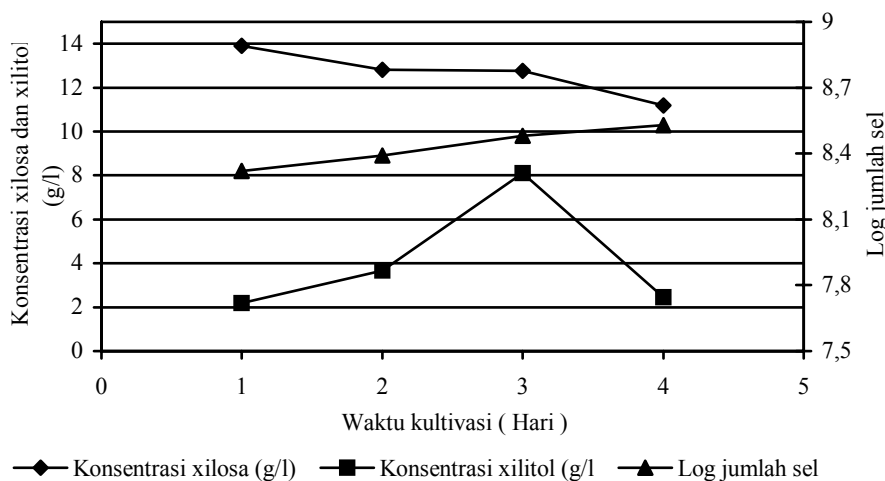
Pada konsentrasi substrat 20% dan 30%, nilai *yield* terbesar terdapat pada kultivasi hari ketiga. Dari kedua konsentrasi ini diperoleh nilai *yield* yang



Gambar 1. Konsentrasi xilosa, konsentrasi xilitol dan pertumbuhan sel pada konsentrasi substrat hidrolisat hemiselulosa bagase 10%.



Gambar 2. Konsentrasi xilosa, konsentrasi xilitol dan pertumbuhan sel pada konsentrasi substrat hidrolisat hemiselulosa bagase 20%.



Gambar 3. Konsentrasi xilosa, konsentrasi xilitol dan pertumbuhan sel pada konsentrasi substrat hidrolisat hemiselulosa bagase 30%.

dan 0,218 g/g. Pada konsentrasi substrat 20% persentase konsumsi xilosa sebesar 92,89%, lebih banyak dibandingkan dengan konsentrasi substrat 30% yang hanya sebesar 74,33% meskipun jumlah sel pada konsentrasi substrat 30% ($3,0 \times 10^8$ sel/ml) lebih banyak dibandingkan konsentrasi substrat 20% ($2,9 \times 10^8$ sel/ml). Dari kedua konsentrasi substrat terlihat adanya perbedaan kemampuan sel *C. tropicalis* dalam mengkonsumsi xilosa dan pemanfaatannya, baik untuk memenuhi kebutuhannya akan sumber karbon maupun untuk produksi xilitol yang terlihat dari laju konsumsi xilosa yang berbeda.

Pada saat *yield* yang diperoleh mencapai 0,22 g/g, diproduksi xilitol sebesar 10,258 g/l. Hasil ini lebih besar dibandingkan dengan hasil penelitian produksi xilitol oleh Gong *et al.* (1981) dalam Winkelhausen dan Kuzmanova (1998) yaitu sebesar 2,1 g/l dengan menggunakan D-xilosa murni sebagai substrat sebesar 100 g/l dan khamir *C. tropicalis*.

Faktor penting yang berpengaruh dalam produksi xilitol adalah jumlah sel. Menurut Horitsu *et al.* (dalam Winkelhausen dan Kuzmanova, 1998), konsentrasi xilitol dalam media dan aerasi sangat berhubungan dengan jumlah sel di dalam media. Jika jumlah sel sedikit maka akumulasi oksigen menjadi meningkat menyebabkan rendahnya produksi xilitol.

Aerasi merupakan faktor yang penting karena ketersediaan oksigen di dalam media dapat mempengaruhi pertumbuhan khamir, kecepatan pengambilan substrat dan kecepatan pembentukan produk. Pertumbuhan sel khamir dalam konsentrasi substrat 10%, 20% dan 30% yang terus meningkat seiring

dengan menurunnya konsentrasi xilosa di dalam media terlihat pada Gambar 1, 2, dan 3.

Menurut Vongsuvanlert dan Tani (1998), xilitol dapat diproduksi melalui dua jalur metabolisme oleh sel khamir. Xilosa akan direduksi menjadi xilitol oleh NADH atau NADPH dependent xilose reductase atau melalui isomerasi D-xilosa menjadi D-xilulosa oleh D-xilosa isomerase baru kemudian D-xilulosa akan direduksi menjadi xilitol oleh NADH-dependen xilitol dehidrogenase.

Pembentukan xilitol terjadi di bawah kondisi oksigen yang terbatas dengan tujuan untuk mengakumulasi NADH karena keberadaan oksigen dapat menurunkan aktivitas NADH yang berakibat pada menurunnya akumulasi produksi xilitol (Winkelhausen dan Kuzmanova, 1998).

Peningkatan produksi xilitol berbanding lurus dengan meningkatnya konsumsi xilosa oleh khamir (sesuai dengan penelitian Dominguez *et al.* (1996)) karena xilosa terus dikonversi menjadi xilitol sehingga konsumsi xilosa menyebabkan akumulasi xilitol. Terjadinya penurunan produksi xilitol pada hari kultivasi keempat disebabkan karena xilosa sebagai sumber karbon semakin menipis, padahal xilosa terlebih dahulu digunakan oleh *C. tropicalis* untuk memenuhi kebutuhan akan sumber karbon. Akibatnya pada saat kebutuhan sel akan sumber karbon telah terpenuhi, hanya tinggal sedikit xilosa yang dapat dikonversi menjadi xilitol sehingga produksi xilitol menurun. Hal ini sesuai dengan penelitian Suryadi *et al.* (1998), bahwa konsentrasi xilitol akan menurun pada saat atau sesudah akumulasinya sama atau lebih besar dibandingkan konsentrasi dari xilosa.

Menurut Winkelhausen dan Kuzmanova (1998), pada saat sumber karbon terbatas, khamir akan mengkonsumsi xilitol yang telah diproduksinya jika pada saat itu jumlah D-xilosa hampir habis. Hal ini sesuai dengan penelitian Suryadi *et al.* (1998), yang menyatakan bahwa khamir tidak hanya mengkonsumsi D-xilosa tetapi juga mengkonsumsi

xilitol. Penurunan produksi xilitol disebabkan semakin rendahnya jumlah xilosa yang terdapat di dalam media sehingga untuk memenuhi kebutuhan akan sumber karbon maka *C. tropicalis* mengkonsumsi xilitol yang diproduksi.

Efisiensi produksi xilitol

Pertumbuhan sel khamir yang cepat menyebabkan banyaknya jumlah sel yang aktif dan mampu mengkonsumsi xilosa dalam jumlah yang besar sehingga nilai *yield* menjadi tinggi. Nilai *yield* yang tinggi menyebabkan efisiensi produksi xilitol menjadi tinggi, seperti terlihat pada Gambar 4.

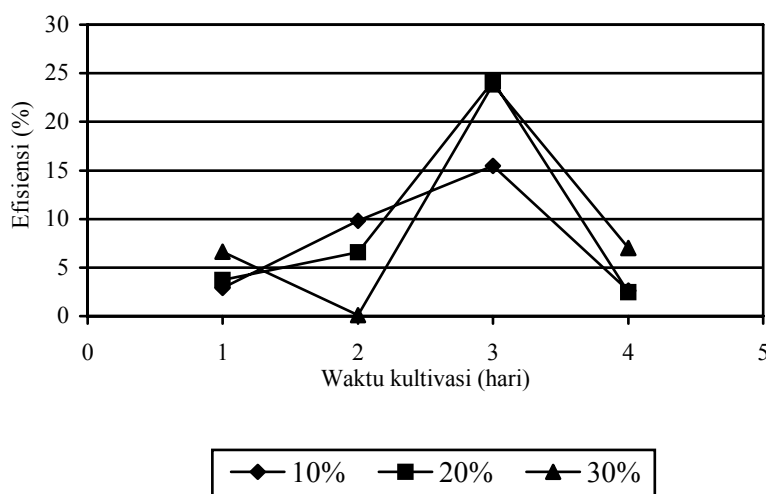
Jumlah sel yang tinggi pada konsentrasi substrat 10% menyebabkan terjadinya peningkatan pada konsumsi xilosa sementara produksi xilitol tidak terlalu besar dikarenakan substrat yang sedikit digunakan khamir untuk pertumbuhan sel sehingga produksi xilitol menjadi berkurang dan efisiensinya menjadi rendah.

Efisiensi yang tinggi (24,21%) terjadi pada konsentrasi substrat 20% karena adanya keseimbangan konsumsi xilosa yang digunakan untuk pertumbuhan dan untuk produksi xilitol. Sementara pada konsentrasi 30% terjadi penurunan konsumsi xilosa oleh khamir dibanding dengan konsentrasi yang lainnya sehingga efisiensinya tidak terlalu tinggi. Hal tersebut dikarenakan konsentrasi xilosa yang tinggi menyebabkan banyaknya zat-zat inhibitor di dalam media sehingga produksi xilitol menjadi rendah.

Efisiensi proses biokonversi biasanya dilihat dari besarnya nilai *yield*. Jika suatu proses biokonversi memiliki nilai *yield* mendekati 1 artinya hampir seluruh substrat yang dikonsumsi diubah menjadi produk. Menurut Barbosa *et al.* (1988) dalam Roberto *et al.* (1996a), nilai *yield* untuk produksi xilitol secara teoritis sebesar 0,917 g/g. Nilai *yield* tertinggi yang dihasilkan dari penelitian ini sebesar 0,22 g/g, lebih rendah dibandingkan nilai teoritisnya. Nilai *yield* tersebut menunjukkan bahwa

belum semua substrat yang dikonsumsi khamir diubah menjadi produk karena konsumsi substrat berkaitan erat dengan pertumbuhan khamir yang dipengaruhi oleh faktor eksternal sel dan faktor internal sel.

Faktor yang berkaitan erat dengan nilai *yield* produksi xilitol adalah suhu lingkungan untuk produksi xilitol. Pada penelitian ini digunakan suhu kamar dalam produksi xilitol yang sebenarnya kurang optimum untuk pertumbuhan *C. tropicalis* karena suhu optimum untuk pertumbuhan *C. tropicalis* adalah 30°C. Kurang optimumnya pertumbuhan *C. tropicalis* menyebabkan aktivitasnya dalam memproduksi xilitol pun kurang optimal.



Gambar 4. Efisiensi produksi xilitol pada berbagai variasi konsentrasi substrat hidrolisat hemiselulosa bagase selama 4 hari kultivasi.

KESIMPULAN DAN SARAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pertumbuhan *C. tropicalis* selama 4 hari kultivasi meningkat pada masing-masing variasi konsentrasi hidrolisat hemiselulosa bagase. Produksi xilitol optimum diperoleh pada media produksi yang mengandung 20% substrat hidrolisat hemiselulosa bagase pada hari ketiga kultivasi dengan produksi xilitol 10,258 g/l, *yield* 0,22 g/g dan jumlah sel $2,9 \times 10^8$ sel/ml. Efisiensi produksi xilitol yang optimum dari hidrolisat hemiselulosa bagase oleh *C. tropicalis* terbesar sebesar 24,21% pada konsentrasi substrat 20% kultivasi hari ketiga.

Berdasarkan hasil penelitian ini diperlukan adanya penelitian mengenai variasi konsentrasi substrat antara 20% dan 30% untuk mengoptimalkan produksi xilitol dengan memvariasikan waktu kultivasi dalam satuan jam. Penelitian mengenai adanya zat-zat lain selain xilosa dan xilitol yang terdapat dalam hidrolisat hemiselulosa bagase serta pengaruhnya terhadap produksi xilitol oleh *Candida tropicalis*, optimasi suhu produksi untuk mengoptimalkan pertumbuhan *C. tropicalis* dan penelitian dengan menggunakan khamir lain juga sangat diperlukan.

DAFTAR PUSTAKA

- Dills, W.L Jr. 1989. Sugar alcohols as bulk sweeteners. *Annual Review Nutrition* 9: 161-186.
- Dominguez, J.M., C.S. Gong, and G.T. Tsao. 1996. Pretreatment of sugar cane bagasse hemicellulose hydrolysate for xylitol production by yeast. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 57/58: 49-56.
- Fardiaz, S. 1987. *Fisiologi Fermentasi*. Bogor: Pusat Antar Universitas Institut Pertanian Bogor.
- Felipe, M.G.A., M. Vitolo, I.M. Mancilha, and S.S. Silva, 1997. Environmental parameters affecting xylitol production from sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolyzate by **Candida guilliermondii**. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 18: 251-254.
- Granstrom, T. 2002. *Biotechnological Production of Xylitol with Candida Yeast*. abstract: Helsinki University of Technology. <http://www.libhut.fi/Diss/2002>.
- Kusuma, I.R. 2002. *Optimasi Cara Hidrolisis dan Sumber Nitrogen dalam Biokonversi Hidrolisat Hemiselulosa dari Ampas Tebu Menjadi Xilitol oleh Hansenula polymorpha*. [Skripsi]. Jakarta: Universitas Indonesia
- Lutony, T.L. 1993. *Tanaman Sumber Pemanis*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Pfeifer, M.J., S.S. Silva, M.G.A. Felipe, I.C. Roberto, and I.M. Mancilha. 1996. Effect of culture conditions on xylitol production by **Candida guilliermondii** FTI 20037. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 57/58: 423.
- Roberto, I.C., S. Sato, dan I.M. Mancilha, 1996a. Effect of inoculum level on xylitol production from rice straw hemicellulose hydrolysate by **Candida guilliermondii**. *Journal of Industrial Microbiology* 16: 348-350.
- Roberto, I.C., S.S. Silva, M.G.A. Felipe, I.M. Mancilha, and S. Sato. 1996b. Bioconversion of rice straw hemicellulose hydrolysate for the production of xylitol. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 57/58: -
- Rodrigues, D.C.G.A., S.S. Silva, and M.G.A. Felipe. 1998. Using response-surface methodology to evaluate xylitol production by **Candida guilliermondii** by fed-batch process with exponential feeding rate. *Journal of Biotechnology* 62: 73-77.
- Suryadi, H., T. Katsuragi, N. Yoshida, S. Suzuki, and Y. Tani. 2000. Polyol production by culture of methanol utilizing yeast. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 89 (3): -
- Vongsuvanlert, V and Tani, Y. 1989. Xylitol Production by A Methanol Yeast, **Candida boidinii** (Kloeckera Sp.) No 2201. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 67 (1): -
- Winkelhausen, E and S. Kuzmanova. 1998. Microbial conversion of D-Xylose to xilitol. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 86 (1): 1-14.

Pertumbuhan dan Produksi Saponin Kultur Kalus *Talinum paniculatum* Gaertn. pada Variasi Penambahan Asam 2,4-Diklorofenoksi Asetat (2,4-D) dan Kinetin

Growth and saponin production of Talinum paniculatum Gaertn. callus culture on various addition with 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) and kinetin

DIAN PRAMITA WARDANI, SOLICHATUN*, AHMAD DWI SETYAWAN

Jurusan Biologi FMIPA Universitas Sebelas Maret Surakarta 57126.

* Korespondensi: Jl. Ir. Sutami 36A Surakarta 57126. Tel. & Fax.: +62-271-663375. e-mail: olich@mipa.uns.ac.id.

Diterima: 17 Agustus 2002. Disetujui: 28 Pebruari 2003.

Abstract. The objectives of the research were to study the effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and kinetin on callus growth and saponin production from *Talinum paniculatum* Gaertn. callus. The outline of the research was *T. paniculatum* as a medicinal plant potentially to be developed with *in vitro* culture method. The addition of 2,4-D and kinetin in culture's medium would induce protein synthesis, furthermore it would influence cell proliferation and cell metabolism with regulation enzyme action, so that both of induced callus growth and secondary metabolism production from the cell that be cultured. The research used factorial completely randomized design with two factors (2,4-D concentration: 0 mg l⁻¹, 0.5 mg l⁻¹, 1 mg l⁻¹, 1.5 mg l⁻¹ and kinetin concentration: 0 mg l⁻¹, 0.5 mg l⁻¹, 1 mg l⁻¹, 1.5 mg l⁻¹) with three replicates. Data that be collected were qualitative data (callus morphology included texture and colour of callus) and quantitative data (callus growth rate, callus wet weight, callus dry weight and saponin content). Data were analyzed by using Anova and followed by DMRT 5% confidence level and correlation regression. The result of the research indicated that the treatment with addition plant regulation (2,4-D and kinetin) on MS medium have significant effect on callus growth and saponin production. Addition 2,4-D 1.5 mg l⁻¹ and kinetin 1.5 mg l⁻¹ as an optimum combination concentration to induce callus growth and saponin production.

Keywords: callus growth, saponin, *Talinum paniculatum* Gaertn., 2,4-D and kinetin.

PENDAHULUAN

Pemanfaatan tumbuhan sebagai bahan baku obat terus meningkat. Sampai saat ini, sebagian besar bahan baku tanaman obat masih dipanen dari alam seiring dengan kembalinya masyarakat memanfaatkan tumbuhan sebagai bahan obat alami (Lestari dan Mariska, 1997). Sintesis senyawa obat secara alami belum mencukupi kebutuhan masyarakat karena produksinya masih sangat rendah. Oleh karena itu dibutuhkan suatu metode untuk meningkatkan kandungan senyawa metabolit sekunder tanaman yang berfungsi sebagai senyawa obat.

Banyak terpenoid dan steroid alkohol yang terdapat di alam bukan sebagai alkohol bebas, tetapi sebagai glikosida misalnya saponin (Robinson, 1995). Saponin banyak digunakan sebagai bahan baku obat tradisional. Saponin ini merupakan salah satu senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam beberapa tanaman obat contohnya *Talinum paniculatum* Gaertn.

T. paniculatum (som jawa) merupakan herba tahunan, tingginya 30-60 cm (Heyne, 1987). Tumbuhan ini termasuk dalam famili *Portulaca-*

ceae dan merupakan tanaman obat yang digunakan sebagai bahan baku obat tradisional atau jamu (Hutapea, 1991). *T. paniculatum* mengandung saponin, flavonoid, tanin, triterpen/sterol, polifenol, dan minyak atsiri (Saroni dkk., 1999). Tumbuhan ini sering digunakan sebagai pengganti ginseng (*Panax ginseng*); ginseng maupun som jawa lebih banyak digunakan sebagai tonik (menguatkan tubuh). Selama ini penggunaan kedua tumbuhan ini terutama banyak digunakan untuk membantu penyembuhan penyakit dan memperkuat daya tahan tubuh. Selain itu, som jawa terutama daun dan akarnya sering digunakan sebagai obat anti radang untuk mengurangi pembengkakan (Sumastuti, 1999). Nilai ekonomi yang lain dari saponin terletak pada penggunaannya sebagai bahan dasar industri hormon seks, kortikosteroid dan turunan steroid (Manitto, 1992). Kandungan saponin tanaman *T. paniculatum* dapat ditingkatkan produksinya, salah satunya dengan menggunakan teknik kultur *in vitro*.

Kultur *in vitro* dapat digunakan sebagai sarana penghasil senyawa metabolit sekunder. Hal ini disebabkan karena metabolit sekunder merupa-

kan hasil dari proses-proses biokimia yang terjadi pada tubuh tanaman secara utuh, sedang proses-proses tersebut juga terjadi pada kultur *in vitro*. Pada kultur *in vitro*, senyawa ini terdapat pada kalus atau bagian lain seperti daun, akar, dan batang (Ignacimuthu, 1997). Produksi metabolit sekunder melalui kultur *in vitro* dipengaruhi oleh berbagai faktor baik genetis maupun kondisi lingkungan kultur.

Adanya perbedaan kondisi lingkungan pertumbuhan antara kultur *in vitro* dan tumbuhan asalnya, memungkinkan suatu kultur jaringan tanaman mempunyai kandungan metabolit sekunder yang berbeda dengan tanaman asal, baik secara kuantitatif maupun kualitatif (Gunawan, 1992). Penggunaan kultur *in vitro* untuk meningkatkan produksi metabolit sekunder terutama senyawa obat, dianggap lebih menguntungkan dibandingkan produksi tanaman utuh, karena dalam kultur *in vitro* pasokan zat hara yang teratur dapat dijamin serta dimungkinkan pula untuk pengaturan proses metabolisme sehingga dapat diperoleh hasil yang sebesar-besarnya (Kurz dan Constabel, 1991).

Sejauh ini penelitian tentang metabolit sekunder som jawa secara *in vitro* belum banyak dilakukan. Dalam penelitian ini, sumber eksplan yang dipakai adalah daun som jawa. Melalui kultur *in vitro* diharapkan kandungan saponin yang terdapat pada som jawa dapat ditingkatkan. Pemberian zat pengatur tumbuh (ZPT) pada sel maupun kalus dapat mempengaruhi produksi senyawa metabolit sekunder tertentu (Toruan dkk., 1990). Menurut Abidin (1982) ZPT dapat mengatur proses-proses fisiologi tanaman karena ZPT mempengaruhi sintesis protein dan mengatur aktivitas enzim. Zat pengatur tumbuh mempengaruhi metabolisme asam nukleat yang berperan dalam sintesis protein dan mengatur aktivitas enzim untuk pertumbuhan tanaman.

Penelitian ini menggunakan ZPT dari jenis auksin berupa 2,4-D dan sitokinin berupa kinetin. Pemberian 2,4-D secara eksogen diharapkan dapat memenuhi kebutuhan hormon auksin dalam eksplan sehingga akan meningkatkan sintesis protein sebagai bahan baku penyusun enzim yang nantinya dapat memacu kerja enzim dalam proses metabolisme tubuh.

Penelitian tentang metabolit sekunder som jawa dengan menggunakan teknik kultur *in vitro* belum banyak dilakukan, oleh karena itu hasil penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai alternatif usaha peningkatan produksi saponin sebagai bahan baku obat dengan cara menginduksi pertumbuhan kalus yang menghasilkan metabolit sekunder berkadar tinggi dibandingkan dengan produksi tanaman utuh.

Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari pengaruh pemberian variasi zat pengatur tumbuh 2,4-D dan kinetin pada berbagai konsentrasi terhadap pertumbuhan dan produksi saponin kalus *T. paniculatum*.

BAHAN DAN METODE

Tempat dan waktu penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Oktober 2002 s.d. Maret 2003. Lokasi penelitian di Sub Lab. Biologi, Laboratorium Pusat MIPA UNS Surakarta.

Bahan tanaman

Daun ketiga dari pucuk tanaman *T. paniculatum* yang diperoleh dari biji yang telah dikecambahkan sampai berumur 1 bulan di rumah kaca.

Cara kerja

Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan dua faktor, yaitu konsentrasi asam 2,4-diklorofenoksiasetat (D) yang terdiri dari 4 taraf dan konsentrasi kinetin (N) yang terdiri dari 4 taraf:

Perlakuan dengan pemberian 2,4-D:

D₀ perlakuan dengan konsentrasi 0 mg/l sebagai kontrol
D₁ perlakuan dengan konsentrasi 0,5 mg/l
D₂ perlakuan dengan konsentrasi 1,0 mg/l
D₃ perlakuan dengan konsentrasi 1,5 mg/l

Perlakuan dengan pemberian kinetin:

N₀ perlakuan dengan konsentrasi 0 mg/l
N₁ perlakuan dengan konsentrasi 0,5 mg/l
N₂ perlakuan dengan konsentrasi 1,0 mg/l
N₃ perlakuan dengan konsentrasi 1,5 mg/l

Setiap kombinasi perlakuan dengan 3 ulangan.

Tabel 1. Variasi konsentrasi perlakuan.

N/D	N ₀	N ₁	N ₂	N ₃
D ₀	D ₀ N ₀	D ₀ N ₁	D ₀ N ₂	D ₀ N ₃
D ₁	D ₁ N ₀	D ₁ N ₁	D ₁ N ₂	D ₁ N ₃
D ₂	D ₂ N ₀	D ₂ N ₁	D ₂ N ₂	D ₂ N ₃
D ₃	D ₃ N ₀	D ₃ N ₁	D ₃ N ₂	D ₃ N ₃

Persiapan penelitian

Sterilisasi alat. Botol kultur, skapel, gunting, cawan petri dicuci dengan deterjen lalu dikeringkan. Setelah kering, alat-alat yang akan digunakan untuk penanaman dibungkus dengan kertas, sedangkan botol kultur ditutup dengan alumunium foil, kemudian alat-alat tersebut disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 30 menit.

Pembuatan media. Komposisi yang digunakan adalah media dasar MS, baik hara makro dan mikro ditambah dengan vitamin, gula dan agar kemudian ditambah dengan akuades hingga volume 1000 ml. Keasaman media diatur pada pH 5,6-5,8 dengan ditambahkan NaOH 1 N jika terlalu asam atau HCl 1 N jika terlalu basa. Setelah pH stabil, larutan media dimasak sampai mendidih dan dituang ke dalam botol kultur yang telah steril. Media disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 28 menit (Hendaryono dan Wijayani, 1994).

Media induksi kalus. Media yang digunakan untuk induksi kalus adalah media MS ditambah dengan 2,4-D 0,5 mg/l dan kinetin 0,5 mg/l.

Media perlakuan. Media perlakuan adalah media dengan komposisi sama dengan media induksi kalus. Dalam media perlakuan juga ditambah lagi 2,4-D, dan kinetin sesuai taraf konsentrasi yang digunakan.

Pelaksanaan penelitian

Uji busa. Merupakan percobaan awal untuk mengetahui ada tidaknya saponin dalam daun som jawa. Daun som jawa digerus dengan mortal kemudian dilarutkan dalam akuades sambil dikocok kuat-kuat selama 1 menit. Saponin (+) ditunjukkan dengan adanya busa yang stabil selama 30 menit (Harborne, 1996).

Induksi kalus. Tahap ini bertujuan untuk menghasilkan kalus dengan media induksi kalus. Sterilisasi bahan tanaman yang diambil dari lapangan dimulai dengan pencucian dan pembuangan bagian yang kotor dengan air mengalir, daun sebagai sumber eksplan dicuci lalu direndam dengan deterjen sambil dikocok-kocok sekitar 5 menit, kemudian dibilas dengan air mengalir. Setelah itu daun direndam dalam alkohol 70% selama 5 menit, kemudian direndam dalam akuades steril selama 5 menit. Setelah itu direndam dalam klorok 20% selama 10 menit lalu dimasukkan dalam akuades steril selama 10 menit dan terakhir dicuci beberapa kali dengan akuades steril (Jokopriyambodo dkk., 1999).

Setelah sterilisasi dilanjutkan dengan penanaman eksplan dalam media. Penanaman dilakukan dalam *laminar air flow cabinet* (LAF), eksplan yang sudah steril dipotong kecil pada bagian tengah daun meliputi tulang dan daging daun dengan ukuran (1x1) cm, diambil dengan pinset steril, lalu ditanam dalam botol kultur berisi media MS, kemudian botol ditutup dengan *aluminium foil*, setelah itu ditutup lagi dengan plastik *clean wrap*. Botol kultur yang sudah berisi eksplan disimpan dalam rak kultur di ruang kultur dan dijaga cahaya, suhu dan kelembabannya. Untuk menghindari kontaminasi, setiap 2 hari sekali botol kultur dan rak kultur disemprot alkohol 70%.

Perlakuan pemberian ZPT. Kalus yang dihasilkan dari media induksi pada percobaan induksi kalus diperbanyak (disubkulturkan) setelah kalus berumur 4 minggu. Empat minggu setelah dilakukan subkultur, kalus yang dihasilkan ditanam dalam media perlakuan. Pengamatan dilakukan pada saat kalus berumur 4 minggu setelah perlakuan.

Pengamatan

Pengamatan kalus. Pengamatan kalus meliputi warna dan koloni sel-sel kalus.

Pengukuran parameter pengamatan. Berat basah kalus diukur dengan cara penimbang kalus awal (WW₀) dan kalus akhir (WW_t). Laju pertum-

bahan kalus diperoleh dengan menggunakan hasil dari pengukuran berat basah kalus awal dan berat basah kalus akhir dengan rumus (Sitompul dan Guritno, 1995):

$$LPk = \frac{WW_t - WW_0}{t}$$

Berat kering kalus diukur dengan penimbangan kalus yang telah dikeringkan dalam oven bertemperatur $\pm 70^\circ\text{C}$ hingga beratnya konstan.

Analisis kadar saponin pada kalus. Kalus kering digerus dengan mortal hingga menjadi serbuk halus. Serbuk ini dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan diekstraksi dengan etanol 70% di atas penangas air pada suhu 80°C selama 15 menit (Stahl, 1985). Hasil ekstraksi diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada $\lambda = 365 \text{ nm}$ dengan menggunakan saponin Merck sebagai larutan pembanding (Stahl, 1985).

Penghitungan kadar saponin. Absorbansi yang telah diperoleh dari analisis kandungan saponin secara spektrofotometer dikonversi ke dalam molaritas (M atau mol/l) dengan menggunakan persamaan rumus Lambert-Beer, $A = \varepsilon BC$, dengan A = absorbansi, ε = koefisien ekstingsi molar ($1 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), B = tebal larutan (1 cm), dan C = konsentrasi larutan (M atau mol/l) (Roth dan Blaschke, 1985). Adapun langkah-langkahnya sebagai berikut: larutan standar saponin Merck yang akan digunakan diukur absorbansinya terlebih dahulu. Koefisien ekstingsi molar (ε) dihitung menggunakan rumus Lambert-Beer. Absorbansi yang telah diperoleh dari larutan sampel dihitung konsentrasinya dengan menggunakan rumus Lambert-Beer yang telah diketahui koefisien ekstingsinya tersebut.

Analisis data

Analisis yang digunakan adalah analisis kualitatif dan kuantitatif. Analisis kualitatif meliputi warna dan tekstur kalus, sedangkan analisis kuantitatif meliputi laju pertumbuhan kalus, berat basah kalus, berat kering kalus, dan kadar saponin pada setiap perlakuan. Data ini kemudian dianalisis sidik ragam dengan menggunakan uji ANAVA dan dilanjutkan dengan uji DMRT taraf 5%. Untuk mengetahui hubungan antar variabel yang diteliti dilanjutkan analisis dengan menggunakan uji regresi korelasi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Morfologi kalus

Morfologi kalus pada media inisiasi

Kalus adalah proliferasi masa jaringan yang belum terdiferensiasi. Masa sel ini terbentuk di seluruh permukaan irisan eksplan sehingga semakin luas permukaan irisan eksplan semakin cepat dan semakin banyak kalus yang terbentuk (Hendaryono dan Wijayani, 1994). Senyawa 2,4-

D merupakan salah satu jenis auksin yang sangat efektif untuk menginduksi pembentukan kalus, walaupun auksin yang berperan utama tetapi sitokinin sangat dibutuhkan untuk proliferasi kalus sehingga kombinasi auksin dan sitokinin sangat baik untuk memacu pertumbuhan kalus (Abidin, 1982).

Penggunaan kombinasi zat pengatur tumbuh, 2,4-D dan kinetin dengan konsentrasi 0,5 mg/l mampu menginduksi terbentuknya kalus som jawa yang berasal dari potongan daun secara *in vitro*. Pada umur 7-10 hari setelah dikulturkan mulai terlihat inisiasi kalus di sepanjang irisan daun untuk semua kombinasi perlakuan yang diujikan. Penambahan 2,4-D dan kinetin dengan konsentrasi yang seimbang ternyata mampu merangsang sel daun untuk melakukan proses dediferensiasi membentuk kalus.

Penampakan kalus pada semua perlakuan pada awalnya berwarna putih remah (*friable*), kemudian pada awal pertengahan minggu ketiga kalus yang terbentuk semakin banyak dan warnanya berubah menjadi coklat muda dengan struktur kompak. Pada akhir minggu ketujuh kalus mulai berubah warna menjadi coklat tua dan akhirnya kehitaman. Hal ini disebabkan senyawa fenol di jaringan mulai terbentuk, sehingga kalus harus segera disubkultur.

Morfologi kalus pada media perlakuan

Kalus pada media perlakuan mengalami pertambahan volume karena terjadi pembesaran sel. Pada umumnya ukuran kalus menjadi dua kali ukuran semula, yang ditunjukkan dengan peningkatan berat basah kalus akhir menjadi dua kali berat basah kalus awal. Pemberian kombinasi zat pengatur tumbuh antara auksin dan sitokinin dimaksudkan untuk merangsang pembesaran, proliferasi sel dan pertumbuhan kalus dari eksplan yang ditanam.

Kalus pada media perlakuan mempunyai susunan sel yang kompak, rapat, padat, dan sulit dipisah-pisahkan. Pada permukaan bawah eksplan yang tumbuh menjadi kalus terlihat kondisi jaringan yang berair. Kondisi ini disebabkan bagian jaringan yang ada di permukaan bawah langsung bersentuhan dengan media dan berperan sebagai area penyerapan media.

Warna kalus pada awal perlakuan semula berwarna coklat sampai coklat kehitaman kemudian pada awal minggu pertama terbentuk kalus baru yang berwarna kuning bening kemudian warna kalus ini akan berubah menjadi kecoklatan seiring dengan pertumbuhan kalus yang semakin tua. Kondisi warna kalus yang bervariasi menurut Hendaryono dan Wijayani (1994) disebabkan oleh adanya pigmentasi, pengaruh cahaya, dan bagian tanaman yang dijadikan sebagai sumber eksplan. Eksplan yang cenderung berwarna kecoklatan disebabkan oleh kondisi eksplan yang secara internal mempunyai kandungan fenol tinggi. Fenol akan teroksidasi menjadi kuinon fenolik oleh pengaruh cahaya.

Kalus pada perlakuan 1,5 mg/l 2,4-D dan 1,5 mg/l kinetin (D_3N_3) mempunyai warna hijau kekuningan. Hal ini disebabkan karena 2,4-D efektif untuk memacu pembentukan kalus karena aktivitasnya yang kuat untuk memacu proses dediferensiasi sel, menekan organogenesis serta memacu pertumbuhan kalus (Lestari dan Mariska, 1997). Warna kalus yang hijau disebabkan peningkatan konsentrasi sitokinin yang tinggi. Sitokinin yang ditambahkan dalam media mampu menghambat perombakan butir-butir klorofil karena sitokinin mampu mengaktifkan proses metabolisme dan sintesis protein (Wattimena, 1991). Hal ini ditunjukkan dengan data yang diperoleh pada perlakuan dengan pemberian sitokinin yang tinggi didapatkan warna kalus yang berwarna hijau (Tabel 2).

Tabel 2. Tekstur dan warna kalus *T. paniculatum* pada media perlakuan.

No	Warna		Tekstur	
	Awal	Akhir	Awal	Akhir
1.	Coklat tua	Kuning bening, coklat sedang	Kompak	Kompak, berair
2.	Coklat tua	Kuning bening, coklat tua kehitaman	Kompak	Kompak, berair
3.	Coklat tua	Kuning bening, coklat tua kehitaman	Kompak	Kompak, berair
4.	Coklat sedang	Kuning bening, coklat sedang	Kompak	Kompak, berair
5.	Coklat tua	Kuning bening, coklat sedang kehitaman	Kompak	Kompak, berair
6.	Coklat sedang	Kuning bening, coklat sedang	Kompak	Kompak, berair
7.	Coklat sedang	Kuning bening, hijau kekuningan, coklat muda	Kompak	Kompak, berair
8.	Coklat sedang	Kuning bening, coklat sedang	Kompak	Kompak, berair
9.	Coklat sedang	Kuning bening, coklat sedang	Kompak	Kompak, berair
10.	Coklat tua	Kuning bening, coklat sedang	Kompak	Kompak, berair
11.	Coklat tua	Coklat sedang	Kompak	Kompak, berair
12.	Coklat sedang	Kuning bening, hijau kekuningan, coklat muda	Kompak	Kompak, berair
13.	Coklat tua	Kuning bening, coklat tua	Kompak	Kompak, berair
14.	Coklat tua	Kuning bening, coklat sedang	Kompak	Kompak, berair
15.	Coklat sedang	Kuning bening, coklat muda	Kompak	Kompak, berair
16.	Coklat tua	Kuning bening, hijau kekuningan, coklat tua kehitaman	Kompak	Kompak, berair

Keterangan: Penambahan 2,4-D: D0: 0 mg/l; D1: 0,5 mg/l; D2: 1 mg/l; D3: 1,5 mg/l. Penambahan kinetin: N0: 0 mg/l; N1: 0,5 mg/l; N2: 1 mg/l; N3: 1,5 mg/l.

Tabel 3. Laju pertumbuhan kalus *T. paniculatum* (mg/hr).

Penambahan 2,4-D	Penambahan Kinetin				Rerata
	0 mg/l	0,5 mg/l	1 mg/l	1,5 mg/l	
0 mg/l	12,30 ^{de}	9,90 ^e	21,80 ^{cde}	37,20 ^{bcde}	2,03 ^C
0,5 mg/l	30,70 ^{bcde}	31,80 ^{bcde}	27,90 ^{bcde}	40,20 ^{bcde}	3,27 ^C
1 mg/l	46,50 ^{bcde}	49,60 ^{bcd}	50,90 ^{bc}	51,30 ^{bc}	4,96 ^B
1,5 mg/l	60,00 ^b	52,10 ^{bc}	64,80 ^{ab}	96,40 ^a	6,83 ^A
Rerata	3,74 ^B	3,59 ^B	4,14 ^{AB}	5,63 ^A	

Keterangan: angka-angka dalam kolom dan baris yang sama tidak berbeda nyata dalam DMRT pada taraf uji 5% jika dibelakangnya terdapat huruf yang sama.

Laju pertumbuhan kalus

Data yang diperoleh menunjukkan bahwa perlakuan untuk setiap tingkat kombinasi konsentrasi antara 2,4-D dan kinetin yang diuji memberikan laju pertumbuhan kalus yang berbeda nyata (Tabel 3). Semakin tinggi kombinasi konsentrasi zat pengatur tumbuh yang ditambahkan dalam medium menyebabkan laju pertumbuhan kalus semakin tinggi yang ditunjukkan oleh peningkatan berat basah kalus akhir. Laju pertumbuhan kalus tertinggi (96,40 mg/hr) diperoleh dari perlakuan kombinasi 1,5 mg/l 2,4-D dan 1,5 mg/l kinetin pada masa inkubasi 5 minggu.

Pada awal masa inkubasi, laju pertumbuhan kalus tidak mengalami peningkatan yang berarti kemudian mencapai optimum pada masa inkubasi 4-5 minggu. Laju pertumbuhan kalus dapat ditingkatkan dengan jalan mengatur komposisi media tumbuh yang digunakan, salah satunya dengan penambahan zat pengatur tumbuh. Penggunaan auksin 2,4-D dapat memacu pertumbuhan kalus, sedangkan penambahan sitokinin dalam media sangat dibutuhkan untuk meningkatkan pembelahan sel, karena sitokinin berperan dalam pembentukan benang gelendong pada tahap metafase (Gunawan dkk., 1992) sehingga pemberian kombinasi antara auksin dan sitokinin dapat memberikan hasil yang lebih baik untuk meningkatkan laju pertumbuhan kalus.

Penambahan 2,4-D dalam media ternyata efektif untuk meningkatkan laju pertumbuhan kalus. Semakin tinggi konsentrasi 2,4-D yang ditambahkan semakin meningkatkan laju pertumbuhan kalus. Auksin berupa 2,4-D dapat menaikkan tekanan osmotik, meningkatkan permeabilitas sel terhadap air, menyebabkan pengurangan tekanan pada dinding sel, meningkatkan sintesis protein, meningkatkan plastisitas dan pengembangan dinding sel (Abidin, 1982). Plastisitas dan pengembangan dinding sel didorong oleh pemberian auksin, karena auksin mengeluarkan H^+ ke dalam dinding sel dan H^+ ini menyebabkan pH dinding sel menurun sehingga terjadi pelonggaran struktur dinding (berarti peningkatan plastisitas) dan terjadi pertumbuhan. Menurut Lakitan (1996)

pelonggaran dinding sel terjadi karena pH yang rendah mengaktifkan enzim yang mematahkan ikatan-ikatan antara polisakarida pembatas pada dinding sel kemudian sel akan tumbuh lebih cepat karena adanya kenaikan tekanan turgor.

Pertumbuhan juga membutuhkan pembentukan senyawa bahan baku dinding sel. Pembuatan komponen-komponen dinding sel dan penyusunan kembali ke dalam suatu matriks dinding sel yang utuh juga dipengaruhi oleh 2,4-D dengan jalan

mengaktifkan enzim-enzim yang berperan dalam pembuatan komponen dinding sel (Wattimena, 1991).

Kinetin yang ditambahkan dalam media ternyata menunjukkan beda nyata pada taraf 5%, tetapi hanya kinetin pada konsentrasi 1,5 mg/l saja yang efektif untuk meningkatkan laju pertumbuhan kalus, jadi kinetin dengan konsentrasi di bawah 1,5 mg/l belum mampu mendorong peningkatan laju pertumbuhan kalus. Hal ini dipengaruhi oleh berbagai faktor, menurut Salisbury dan Ross (1995) zat pengatur tumbuh yang ditambahkan dapat bersifat aktif, jika tiga bagian utama dalam sistem respon terpenuhi yaitu zat pengatur tumbuh harus ada dalam jumlah yang cukup di sel yang tepat, zat pengatur tumbuh harus dikenali dan diikat erat oleh protein penerima dalam jaringan sasaran dan protein penerima tersebut harus menyebabkan perubahan metabolik yang mengarah pada penguatan isyarat sehingga dapat menimbulkan respon.

Kinetin berfungsi mendorong pembelahan sel dan sintesis protein. Pemberian kinetin menyebabkan perubahan metabolisme sehingga terjadi penimbunan asam amino, fosfat dan gula di tempat-tempat pemberian sitokinin, hal ini menyebabkan pertumbuhan sel. Selain itu kinetin mempunyai struktur mirip adenin yang terdapat pada DNA dan RNA yang berperan dalam sintesis protein. Menurut Abidin (1982) zat pengatur tumbuh mempunyai peranan besar terhadap sintesis protein, pada proses pra transkripsi zat tumbuh terutama auksin mampu membebaskan DNA dari protein kompleks sehingga bisa terjadi proses transkripsi. Selain itu, menurut Wattimena (1991) zat pengatur tumbuh juga berinteraksi dengan molekul-molekul RNA mempengaruhi sintesis protein pada proses translasi.

Perbedaan laju pertumbuhan kalus selain dipengaruhi oleh peningkatan kecepatan pembelahan sel karena pengaruh pemberian 2,4-D dan kinetin juga dipengaruhi oleh kondisi genetis, umur jaringan dan jenis tanaman serta faktor lingkungan yang meliputi cahaya, kandungan O_2 , suhu dan kelembaban udara (Gunawan dkk., 1992).

Tabel 4. Berat kering kalus *T. paniculatum* (mg).

Penambahan 2,4-D	Penambahan Kinetin				Rerata
	0 mg/l	0,5 mg/l	1 mg/l	1,5 mg/l	
0 mg/l	194,10 ^d	185,40 ^d	244,50 ^{cd}	297,70 ^{abcd}	0,29 ^{AB}
0,5 mg/l	264,70 ^{bcd}	242,00 ^{cd}	255,10 ^{cd}	297,00 ^{abcd}	0,27 ^B
1 mg/l	325,90 ^{abc}	299,70 ^{abcd}	326,70 ^c	336,90 ^{abc}	0,32 ^{AB}
1,5 mg/l	366,80 ^{abc}	363,50 ^{abc}	384,60 ^{ab}	414,60 ^a	0,38 ^A
Rerata	0,29 ^{AB}	0,27 ^B	0,30 ^{AB}	0,34 ^A	

Keterangan: Angka-angka dalam kolom dan baris yang sama tidak berbeda nyata dalam DMRT pada taraf uji 5% jika dibelakangnya terdapat huruf yang sama.

Perlakuan dengan pemberian 0 mg/l 2,4-D dan 0,5 mg/l kinetin ternyata menghasilkan laju pertumbuhan kalus yang sangat rendah, disebabkan karena konsentrasi ZPT yang ditambahkan dalam media masih rendah, sehingga belum optimal untuk meningkatkan laju pertumbuhan kalus. Hal ini dapat dibuktikan dengan peningkatan konsentrasi ZPT yang ditambahkan dalam media dapat meningkatkan laju pertumbuhan kalus (Tabel 3).

Laju pertumbuhan kalus pada perlakuan pemberian 0 mg/l 2,4-D dan 0,5 mg/l kinetin bahkan berada di bawah kontrol hanya sebesar 9,90 mg/hr (Tabel 3), hal ini mungkin disebabkan karena perbedaan kondisi jaringan asal eksplan. Walaupun untuk semua perlakuan digunakan daun kedua tetapi keadaan tiap sel penyusunnya tidaklah sama. Menurut Lakitan (1996) setiap sel mempunyai kepekaan tersendiri terhadap zat tumbuh yang diberikan, selain itu waktu pembelahan sel untuk memperbanyak diri tidak sama karena siklus selnya berbeda-beda. Hal ini mungkin disebabkan karena sel anakan hasil pembelahan sebelumnya mempunyai ukuran yang berbeda sehingga siklus selnya juga berbeda. Menurut Reksoatmodjo (1993) apabila hasil pembelahan menghasilkan dua buah sel anakan yang tidak sama besar, maka siklus sel pada tahap G1 bagi sel anakan yang ukurannya kecil berlangsung lebih lama daripada sel anakan yang ukurannya besar.

Perbedaan laju pertumbuhan juga dipengaruhi oleh kemampuan jaringan untuk menyerap zat-zat hara yang tersedia, hal ini banyak dipengaruhi oleh aerasi dan tekstur kalus. Kalus yang terlalu padat dan kompak mempunyai kemampuan menyerap zat hara lebih rendah daripada tekstur kalus yang tidak terlalu padat.

Berat kering kalus

Pertumbuhan berkaitan dengan pertambahan volume dan jumlah sel, pembentukan protoplasma baru, pertambahan berat dan selanjutnya terjadi peningkatan berat keringnya (Gunawan dkk., 1992). Menurut Sitompul dan Guritno (1995) pengeringan bertujuan untuk menghentikan aktivitas metabolisme dari bahan tersebut. Berbeda dengan pengukuran berat basah yang masih dipengaruhi oleh lingkungan

dalam aktivitas metabolisme. Sehingga berat kering kalus lebih stabil dibandingkan berat basah kalusnya. Peningkatan berat kering kalus disebabkan oleh meningkatnya aktivitas metabolisme sel penyusun kalus.

Data hasil pengamatan untuk berat kering kalus menunjukkan hasil yang berbeda nyata. Berat kering tertinggi diperoleh dari perlakuan 1,5 mg/l 2,4-D dan 1,5 mg/l kinetin sebesar 414,60 mg (Tabel 4.). Hal ini menunjukkan

pemberian 2,4-D dan kinetin dapat memacu pertumbuhan kalus dan biomasanya, sebagaimana teramati dengan terjadinya penambahan ukuran dan berat kering kalus yang tidak dapat balik.

Berat kering kalus yang dihasilkan sangat tergantung kecepatan sel-sel tersebut membelah diri, memperbanyak diri yang dilanjutkan dengan pembesaran sel. Kecepatan sel membelah diri dapat dipengaruhi kombinasi auksin-sitokinin yaitu kombinasi 2,4-D dan kinetin yang ditambahkan dalam media. Penambahan zat pengatur tumbuh diduga dapat mempengaruhi metabolisme RNA yang berarti berperan dalam sintesis protein melalui proses transkripsi molekul RNA. Kenaikan sintesis protein sebagai sumber tenaga dapat digunakan untuk pertumbuhan sehingga dapat meningkatkan berat kering kalus (Gunawan dkk., 1992).

Penambahan ZPT dalam media untuk meningkatkan berat kering kalus menunjukkan hasil yang berbeda jika ZPT yang ditambahkan tanpa dikombinasikan. Penambahan 2,4-D dalam media menunjukkan beda nyata terhadap peningkatan berat kering kalus, semakin tinggi konsentrasi 2,4-D yang ditambahkan, semakin meningkatkan berat kering kalus. Efek peningkatan berat kering kalus ini berbeda jika ZPT yang ditambahkan dalam media adalah kinetin. Peningkatan berat kering kalus hanya terjadi pada perlakuan dengan pemberian kinetin 1,5 mg/l. Hal ini menunjukkan penambahan 2,4-D lebih efektif untuk meningkatkan berat kering kalus daripada kinetin (Tabel 4). Kinetin yang ditambahkan akan lebih efektif untuk meningkatkan berat kering kalus dengan cara meningkatkan konsentrasinya.

Pada umumnya berat kering kalus akan meningkat dengan peningkatan konsentrasi zat pengatur tumbuh yang diberikan, sebanding dengan peningkatan berat basah kalusnya. Tetapi ada beberapa perlakuan, peningkatan berat basah kalus tidak diikuti dengan peningkatan berat keringnya. Hal ini disebabkan karena kemampuan absorpsi air untuk tiap sel berbeda-beda. Sel-sel yang mempunyai berat basah besar mengandung banyak air, sehingga berat keringnya jauh lebih kecil; sehingga pada saat pengeringan, air yang

Tabel 5. Kandungan saponin kalus *T. paniculatum* (mg/g berat kering).

Penambahan 2,4-D	Penambahan kinetin				Rerata
	0 mg/l	0,5 mg/l	1 mg/l	1,5 mg/l	
0 mg/l	0,21 ^{ef}	0,20 ^f	0,28 ^{def}	0,35 ^{bcdef}	0,26 ^C
0,5 mg/l	0,31 ^{cdef}	0,28 ^{def}	0,30 ^{cdef}	0,35 ^{bcdef}	0,31 ^C
1 mg/l	0,39 ^{abcd}	0,37 ^{bcde}	0,40 ^{abcd}	0,42 ^{abcd}	0,40 ^B
1,5 mg/l	0,48 ^{ab}	0,46 ^{abc}	0,51 ^{ab}	0,55 ^a	0,50 ^A
Rerata	0,26 ^C	0,31 ^C	0,40 ^B	0,50 ^A	

Keterangan: Angka-angka dalam kolom dan baris yang sama tidak berbeda nyata dalam DMRT pada taraf uji 5% jika dibelakangnya terdapat huruf yang sama.

ada dalam sel akan menguap habis sehingga berat kering yang dihasilkannya pun kecil.

Kandungan saponin

Kultur jaringan dapat digunakan untuk memproduksi atau meningkatkan senyawa-senyawa metabolit sekunder dalam tanaman dibandingkan produksi senyawa yang sama secara alami. Dalam penelitian ini digunakan zat pengatur tumbuh untuk menginduksi pertumbuhan kalus *T. paniculatum* yang dapat menghasilkan saponin berkadar tinggi. Ada tidaknya saponin dalam kalus berkaitan dengan kondisi asal jaringan tanaman yang dipakai sebagai eksplan.

Ada beberapa tanaman yang mengandung senyawa metabolit sekunder tertentu dapat ditingkatkan produksinya melalui kultur jaringan, tetapi pada beberapa tanaman yang lain, kultur jaringan justru tidak berhasil meningkatkan kandungan metabolit tanaman (Gunawan, 1992). Ekspresi metabolit sekunder pada tanaman yang dikulturkan selain tergantung dari jenis eksplan yang dipakai juga terkait dengan jenis dan konsentrasi dari zat pengatur tumbuh yang ditambahkan dalam media. Pada kultur kalus *Costus speciosus*, penambahan 2,4-D meningkatkan sintesis diosgenin. Hasil ini akan berbeda pada kultur kalus *Orthosiphon aristatus*, 0,1 mg/l 2,4-D yang dikombinasikan dengan 1,0 mg/l BA merupakan zat pengatur tumbuh terbaik untuk merangsang produksi sinensetin.

Penelitian pendahuluan untuk mengetahui ada tidaknya saponin dalam daun kolesom dilakukan uji busa. Dari hasil pengamatan, daun kolesom mengandung saponin yang ditunjukkan dengan adanya busa yang stabil selama 30 menit dalam akuades. Penambahan 2,4-D dan kinetin dalam media memberikan laju pertumbuhan kalus dan kadar saponin yang berbeda nyata pada taraf 5% untuk meningkatkan kadar saponin dalam kalus. Semakin tinggi kombinasi konsentrasi zat pengatur tumbuh yang diberikan menyebabkan laju pertumbuhan dan kandungan saponin di dalam kalus semakin meningkat.

Laju pertumbuhan kalus tertinggi (96,40 mg/hr) dan kadar saponin tertinggi (0,55 mg/g berat kering kalus) diperoleh dari perlakuan kombinasi 1,5 mg/l 2,4-D dan 1,5 mg/l kinetin

pada masa inkubasi 5 minggu (Tabel 3 dan 5). Pola perubahan laju pertumbuhan dan kadar saponin dalam kalus adalah sama. Penambahan 2,4-D dan kinetin dalam media menyebabkan peningkatan pembelahan sel yang diikuti perbanyakan diri sehingga terjadi peningkatan laju pertumbuhan kalus diikuti dengan peningkatan kadar saponin dalam kalus. Hal ini menunjukkan bahwa dalam kultur kalus *T. paniculatum* saponin dibentuk oleh kalus yang aktif tumbuh. Kemungkinan besar

senyawa skualen pada kalus yang aktif tumbuh tidak diakumulasi terlebih dahulu, tetapi langsung diubah menjadi saponin. Skualen ini merupakan senyawa antara sintesis terpenoid yang dihasilkan melalui jalur asam mevalonat.

Kinetin merupakan salah satu jenis zat pengatur tumbuh yang mempunyai gugus isopentenil pirofosfat karena disintesis melalui jalur asam mevalonat (Salisbury dan Ross, 1995). Penambahan kinetin dalam media diduga dapat langsung digunakan untuk membentuk skualen melalui hidrolisis gugus isopentenil pirofosfatnya. Sedangkan pengaruh langsung 2,4-D terhadap sintesis skualen belum diketahui karena jalur biosintesis dan struktur 2,4-D tidak mempunyai kesamaan dengan saponin, tetapi menurut Wattimena (1991) kualitas dan posisi para dari asam fenoksiasetat sangat berpengaruh untuk merangsang pembentukan saponin dalam sel.

Zat pengatur tumbuh yang ditambahkan memberikan hasil yang berbeda-beda. Penambahan 2,4-D memberikan pengaruh yang berbeda nyata pada semua tingkat konsentrasi yang diujikan untuk peningkatan kandungan saponin kalus *T. paniculatum* (Tabel 5.). Penambahan 2,4-D efektif untuk meningkatkan produksi saponin kalus *T. paniculatum*. Penambahan 2,4-D pada konsentrasi yang rendah ternyata sudah dapat meningkatkan kadar saponin. Semakin tinggi konsentrasi 2,4-D yang ditambahkan dalam media, kadar saponin yang dihasilkan juga semakin meningkat.

Penambahan kinetin tanpa 2,4-D dalam media hanya efektif pada konsentrasi 1,5 mg/l untuk meningkatkan produksi saponin (Tabel 5.). Hal ini diduga karena kandungan sitokinin endogen tanaman *T. paniculatum* sangat rendah, sehingga diperlukan penambahan kinetin dengan konsentrasi yang tinggi untuk meningkatkan kadar saponin kalus. Menurut Salisbury dan Ross (1995) efek utama zat pengatur tumbuh adalah untuk mengatur proses pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Efek utama ini sering diikuti oleh sejumlah respon sekunder lainnya yang tergantung pada keadaan fisiologis sel sasarannya. Penguatan efek utama memegang peranan penting untuk dapat menimbulkan suatu

respon fisiologis sehingga penguatan efek utama harus terjadi karena sitokinin endogen terdapat dalam konsentrasi yang sangat rendah (0,01-0,1 μ M).

Berdasarkan uraian di atas, penambahan kinetin dengan konsentrasi 1,5 mg/l atau lebih akan lebih efektif untuk meningkatkan produksi saponin kultur kalus *T. paniculatum*, hal ini dimungkinkan karena untuk meningkatkan laju pertumbuhan kalus yang optimum diperlukan kinetin dengan konsentrasi 1,5 mg/l. Menurut Gunawan (1992), rendahnya hormon pada tanaman dapat disebabkan karena sel-sel pada tanaman tersebut mempunyai informasi genetik untuk memproduksi hormon tetapi tidak semua gen dapat mengekspresikan informasi tersebut sehingga apabila tanaman tersebut dikulturkan memerlukan zat pengatur tumbuh untuk pertumbuhan dan perkembangan tumbuhan itu sendiri.

Produksi saponin kalus *T. paniculatum* berkaitan dengan laju pertumbuhan dan berat kering kalus. Jika laju pertumbuhan kalusnya tinggi, saponin yang disintesis juga tinggi. Jadi, sintesis saponin terjadi selama pertumbuhan berlangsung. Aktivitas sel selama pertumbuhan seperti pembelahan sel, pertambahan volume dan akhirnya terjadi proliferasi sel dapat ditingkatkan dengan pemberian zat pengatur tumbuh. Peningkatan pembelahan sel oleh pengaruh zat pengatur tumbuh dapat memacu laju pertumbuhan dan peningkatan biomasa kalus yang akhirnya dapat meningkatkan berat kering kalus seiring dengan peningkatan produksi saponinnya.

Pemberian zat pengatur tumbuh dapat mempengaruhi produksi metabolit sekunder, hal ini disebabkan zat pengatur tumbuh yang ditambahkan dapat menyebabkan perubahan fisiologi dan biokimia tumbuhan melalui pengaturan kerja enzim. ZPT akan menginduksi sintesis enzim yang ekspresinya tergantung sintesis RNA dan protein. Peningkatan jumlah enzim yang terlibat dalam metabolit sekunder juga akan meningkatkan senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan. 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.

Zat pengatur tumbuh 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). Zat pengatur tumbuh (2,4-D dan kinetin) terikat pada membran protein penerima di membran plasma sel. Kompleks ikatan ini mengaktifkan enzim fosfolipase C (PLC). Enzim PLC ini menghidrolisis fosfatidil inositol 4,5-

bifosfat (P_1P_2) menghasilkan inositol 1,4,5-trifosfat (IP_3) dan diasil gliserol (DAG). IP_3 bergerak menuju vakuola sehingga menyebabkan terlepasnya Ca^{2+} simpanan masuk ke dalam sitosol. Meningkatnya konsentrasi Ca^{2+} di sitosol menyebabkan empat buah Ca^{2+} bergabung membentuk kompleks dengan kalmodulin tidak aktif menjadi kalmodulin aktif, hal ini mengaktifkan beberapa enzim yang berperan dalam sintesis saponin seperti enzim kinase, skualen sintetase dan enzim NAD^+ kinase. Sedangkan DAG yang tidak larut dalam air berfungsi dalam membran plasma. DAG mengaktifkan enzim pada membran yaitu protein kinase c (PKC). Enzim ini menggunakan ATP untuk memfosforilasi beberapa enzim tertentu yang mengatur pada tahap-tahap metabolisme (Salisbury dan Ross, 1995).

Pengendalian beberapa enzim tertentu sesudah terjadi penerimaan hormon awal dapat mempengaruhi ekspresi gen yang dapat menyebabkan serangkaian proses-proses metabolisme. Zat pengatur tumbuh yang ditambahkan bergabung dengan sejumlah protein penerima kemudian kompleks ZPT-protein penerima bergerak masuk ke dalam inti mempengaruhi aktivitas gen. Aktivitas gen dimulai dengan proses transkripsi DNA menjadi mRNA, yang diikuti oleh translasi mRNA. Selanjutnya, mRNA meninggalkan inti menuju sitosol. Di sitosol, mRNA ditranslasikan di ribosom. Translasi mRNA menyebabkan terbentuknya enzim-enzim baru dan mengaktifkan enzim-enzim tertentu yang mengarah pada proses pertumbuhan dan perkembangan serta sintesis senyawa metabolit sekunder melalui pengaturan kerja enzim (Salisbury dan Ross, 1995).

Tahap awal pembentukan saponin berasal dari proses glikolisis membentuk asam piruvat. Asam piruvat yang terbentuk dioksidasi membentuk asetil ko-A. Asetil ko-A merupakan sumber atom karbon dalam sintesis saponin (Manitto, 1992). Biosintesis saponin dapat dibagi menjadi lima tahap, yaitu: (i) mevalonat, yang merupakan senyawa enam karbon disintesis dari asetil ko-A, (ii) unit isoprenoid dibentuk dari mevalonat melalui pelepasan CO_2 , (iii) enam unit isoprenoid mengadakan kondensasi untuk membentuk senyawa antara yaitu skualen, (iv) skualen mengalami siklisasi untuk menghasilkan senyawa terpenoid, (v) senyawa terpenoid ini akan berikatan dengan glukosa membentuk saponin (Murray *et al.*, 1996; Hopkins, 1999).

Rendahnya produksi saponin dalam kultur kalus *T. paniculatum* kemungkinan disebabkan: (i) struktur kalus merupakan kumpulan dari banyak sel, (ii) sel-sel yang membangun kalus mempunyai fase pertumbuhan tidak seragam, (iii) kurangnya aerasi dalam kultur kalus, (iv) masa inkubasi yang kurang lama. Struktur kalus yang padat, menyebabkan sel-sel di lapisan dalam tidak dapat mengadakan kontak langsung

dengan medium, sehingga aktivitas sintesis yang terjadi di dalam setiap sel juga berbeda. Hal ini dapat mengurangi jumlah senyawa yang dihasilkan (sedikit). Kurangnya aerasi menyebabkan skualen banyak yang terakumulasi sehingga saponin yang dihasilkan sedikit. Menurut Toruan (1990) dalam kultur kalus yang aerasinya sedikit, banyak dijumpai prekursor steroid yaitu skualen, hal ini disebabkan siklus skualen dalam sistem biologi memerlukan O_2 yang cukup, Masa inkubasi yang kurang lama menyebabkan produksi saponin yang dihasilkan kurang optimum. Hal ini dimungkinkan karena kepekaan sel-sel penyusun jaringan terhadap zat pengatur tumbuh yang diberikan tidak sama.

Penggunaan kultur suspensi sel biasanya lebih efektif untuk meningkatkan kandungan senyawa metabolit sekunder. Aerasi dalam kultur suspensi sel bagus karena susunan selnya terpisah antara satu dengan yang lain yang memungkinkan semua selnya dapat mengadakan kontak langsung dengan medium sehingga produksi metabolit sekunder yang dihasilkan lebih tinggi daripada kultur kalus, seperti pada kultur kalus *Costus speciosus* dengan penambahan 2,4-D dalam medium dapat meningkatkan kandungan diosgenin sebesar 1,34% berat keringnya sedangkan dengan menggunakan kultur suspensi sel, kandungan diosgenin dapat ditingkatkan sampai 1,70% berat keringnya (Toruan, 1990).

Produksi saponin akan meningkat seiring peningkatan konsentrasi 2,4-D dan kinetin yang ditambahkan, tetapi untuk perlakuan dengan penambahan 2,4-D 0 mg/l dan kinetin 0,5 mg/l kandungan saponin yang dihasilkan justru lebih rendah daripada kontrol hanya sebesar 0,20 mg/g berat kering (Tabel 5.). Hal ini disebabkan karena pada perlakuan ini laju pertumbuhan kalusnya rendah (Tabel 3.), maka saponin yang dihasilkanpun sedikit. Hal ini dimungkinkan karena pola peningkatan laju pertumbuhan kalus dan kadar saponin sama.

KESIMPULAN

Penambahan 2,4-D dan kinetin dalam media dapat meningkatkan laju pertumbuhan kalus *T. paniculatum* secara *in vitro*. Penambahan 1,5 $mg\ l^{-1}$ 2,4-D dan 1,5 $mg\ l^{-1}$ kinetin dalam media merupakan konsentrasi yang optimum untuk meningkatkan laju pertumbuhan kalus *T. paniculatum* secara *in vitro*. Penambahan 2,4-D dan kinetin dalam media dapat meningkatkan kadar saponin kalus *T. paniculatum* secara *in vitro*. Penambahan 1,5 $mg\ l^{-1}$ 2,4-D dan 1,5 $mg\ l^{-1}$ kinetin dalam media merupakan konsentrasi yang optimum untuk meningkatkan kadar saponin kalus *T. paniculatum* secara *in vitro*.

DAFTAR PUSTAKA

- Abidin, Z. 1982. *Dasar-dasar Pengetahuan tentang Zat Pengatur Tumbuh*. Bandung: Penerbit Angkasa.
- Gunawan, L.W., G.A. Wattimena, N.A. Mattjik, E. Syamsudin, N.M.A. Wiendi, dan A. Ernawati. 1992. *Bioteknologi Tanaman*. Bogor: PAU Bioteknologi IPB.
- Harborne, J.B. 1996. *Metode Fitokimia*. Penerjemah: Padmawinata, K. dan I. Sudiro. Bandung: ITB Press.
- Hendaryono, D.P.S., dan A. Wijayani. 1994. *Teknik Kultur Jaringan*. Yogyakarta: Penerbit kanisius.
- Heyne, K. 1987. *Tumbuhan Berguna Indonesia II*. Jakarta: Yayasan Sarana Wijaya.
- Hopkins, W.G. 1999. *Introduction to Plant Physiology*. New York: John Wiley and Sons.
- Hutapea, J.R. 1991. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia II*. Jakarta: Depkes RI.
- Ignacimuthu, S. 1997. *Plant Biotechnology*. New York: Science Publisher, Inc.
- Jokopriyambodo, W., S. Wahyono, dan Djumidi. 1999. Organogenesis batang som jawa (***T. paniculatum***) secara *in vitro*. *Warta Tumbuhan Obat Indonesia* 5 (4): 1-2.
- Kurz, W.G.W., dan F. Constabel. 1991. Produksi dan isolasi metabolit sekunder. Dalam Wetter, L.R. dan F. Constabel (eds.). *Metode Kultur Jaringan Tanaman*. Penerjemah: Widiyanto, M.B. Bandung: ITB Press.
- Lakitan, B. 1996. *Fisiologi Pertumbuhan dan Perkembangan Tanaman*. Jakarta: PT. Raja Grafindo Persada.
- Lestari, E.G., dan I. Mariska. 1997. Kultur *in vitro* sebagai metode pelestarian tumbuhan obat langka. *Buletin Plasma Nuftah* 2 (1): 298-305.
- Manitto, P. 1992. *Biosintesis Produk Alami*. Penerjemah: Koensoemardiyah. Semarang: IKIP Press.
- Murray, R.K., D.K. Granner, P.A. Mayes, and V.W. Rodwell. 1996. *Biokimia Harper*. Penerjemah: Hartono, A. Jakarta: Buku Kedokteran EGC.
- Reksoatmodjo, S.M.I. 1993. *Biologi Sel*. Yogyakarta: UGM Press.
- Robinson, T. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. Bandung: ITB Press.
- Salisbury, F.B. and C.W. Ross. 1995. *Fisiologi Tumbuhan*. Penerjemah: Lukman, D.R. dan Sumaryono. Bandung: ITB Press.
- Saroni, N., Y. Astuti, dan Adjirni. 1999. Pengaruh infus akar som jawa (***T. paniculatum***) terhadap jumlah dan motilitas spermatozoa pada mencit. *Warta Tumbuhan Obat Indonesia* 5 (4): 13-14.
- Sitompul, S.M., dan B. Guritno. 1995. *Analisis Pertumbuhan Tanaman*. Yogyakarta: UGM Press.
- Stahl, E. 1985. *Analisis Obat secara Kromatografi dan Mikroskopi*. Penerjemah: Padmawinata, K. dan I. Sudiro. Bandung: ITB Press.
- Sumastuti, R. 1999. Efek antiradang infus daun dan akar som jawa (***T. paniculatum***) pada tikus putih *in vivo*. *Warta Tumbuhan Obat Indonesia* 5 (4): 15-17.
- Toruan, N., Solahuddin, S.M Winata, Sastradipradja, dan K. Padmawinata. 1990. Pengaruh 2,4-D, kolesterol Co-60 terhadap pertumbuhan dan kandungan diosgenin dalam kultur jaringan ***Costus speciosus***. *Forum Pascasarjana* 1 (13): 1-14.
- Wattimena, G.A. 1991. *Zat Pengatur Tumbuh*. Bogor: PAU Bioteknologi IPB.

PEDOMAN UNTUK PENULIS

Format penulisan pada nomor ini merupakan acuan utama bagi para penulis, adapun pedoman ini hanya merupakan ringkasannya. Setiap naskah harus disertai surat pengantar yang menyatakan bahwa tulisan merupakan hasil karya penulis atau para penulis dan belum pernah dipublikasikan. Penulis diminta mengirimkan dua kopi naskah dan satu disket ukuran 3½", kecuali naskah yang dikirim melalui e-mail. Pada koreksi terakhir kembali diminta satu disket untuk pencetakan.

Tulisan diketik pada satu sisi kertas putih, ukuran A4 (210x297 mm²), dalam satu kolom, menggunakan spasi ganda, jenis huruf *Times New Roman*, ukuran 12 point, dengan jarak tepi 2 cm di semua sisi. Program pengolah kata atau jenis huruf tambahan dapat digunakan, namun harus *PC compatible* dan berbasis *Microsoft Word*. **Nama ilmiah** (genus, spesies, author), dan kultivar atau strain disebutkan secara lengkap pada penyebutan pertama kali. Nama genus dapat disingkat setelahnya penyebutan yang pertama, kecuali menimbulkan kerancuan. Nama author dapat dihilangkan setelah penyebutan pertama. Misalnya pertama kali ditulis *Rhizopus oryzae* L. UICC 524, selanjutnya ditulis *R. oryzae* UICC 524. Nama daerah dapat dicantumkan apabila tidak menimbulkan makna ganda. Penyebutan nama ilmiah secara lengkap dapat diulang pada bagian Bahan dan Metode. **Tatanama kimia dan biokimia** mengikuti aturan IUPAC-IUB. Simbol-simbol kimia standar dan penyingkatan untuk nama kimia dapat dilakukan apabila jelas dan umum digunakan, misalnya pertama kali ditulis lengkap butilat hidrositoluen (BHT) selanjutnya ditulis BHT. **Ukuran metrik** menggunakan satuan SI, penggunaan satuan lain harus diikuti nilai ekuivalen dengan satuan SI pada penyebutan pertama. Penyingkatan satuan, seperti g, mg, ml, dan sebagainya tidak diikuti titik. Indeks minus (m⁻², l⁻¹, h⁻¹) disarankan untuk digunakan, kecuali dalam hal-hal seperti "per-tanaman" atau "per-plot". **Persamaan matematika** tidak selalu dapat dituliskan dalam satu kolom dengan teks, untuk itu dapat ditulis secara terpisah. **Angka** satu hingga sepuluh dinyatakan dengan kata-kata, kecuali apabila berhubungan dengan pengukuran, sedangkan nilai di atasnya dituliskan dalam angka, kecuali di awal kalimat. Pecahan sebaiknya dinyatakan dalam desimal. Dalam teks digunakan "%" bukannya "persen". Pengungkapan ide dengan kalimat yang rumit dan bertele-tele perlu dihindari, sebaiknya digunakan kalimat yang efektif dan efisien. Naskah hasil penelitian diharapkan tidak lebih dari 25 halaman (termasuk gambar dan tabel), naskah telaah pustaka menyesuaikan, masing-masing halaman berisi 700-800 kata, atau sebanding dengan naskah dalam nomor penerbitan ini.

Judul ditulis secara padat, jelas, dan informatif, maksimum 20 kata. Judul ditulis dalam bahasa Indonesia dan Inggris untuk naskah dalam bahasa Indonesia atau bahasa Inggris saja untuk naskah dalam bahasa Inggris. Naskah yang terlalu panjang dapat dibuat bersegi, tetapi naskah demikian jarang diterbitkan jurnal ini. **Judul pelari** (*running title*) sekitar 5 kata. **Nama penulis** atau para penulis pada naskah kelompok ditulis secara lengkap dan tidak disingkat. **Nama dan alamat institusi** ditulis lengkap dengan nama dan nomor jalan (lokasi), kode pos, nomor telepon, nomor faksimili, alamat e-mail dan website. Pada naskah kelompok perlu ditunjukkan penulis untuk korespondensi beserta alamat dengan urutan seperti di atas. **Abstract** sebaiknya tidak lebih dari 200 kata, ditulis dalam bahasa Indonesia dan Inggris untuk naskah dalam bahasa Indonesia atau bahasa Inggris saja untuk naskah dalam bahasa Inggris. **Kata kunci** (*Keywords*) sekitar 5 kata, meliputi nama ilmiah dan daerah (apabila ada), topik penelitian dan metode-metode khusus yang digunakan. **Pendahuluan** (*Introduction*) sekitar 400-600 kata, meliputi latar belakang, tinjauan pustaka dan tujuan penelitian. **Bahan dan Metode** (*Materials and Methods*) sebaiknya ditekankan pada cara kerja dan cara analisis data. **Hasil dan Pembahasan** (*Results and Discussion*) ditulis sebagai satu rangkaian, pada tulisan yang cukup panjang sebaiknya dibuat beberapa sub judul. Pembahasan merupakan jawaban pertanyaan *mengapa* dan *bagaimana* hasil penelitian dapat terjadi, bukan sekedar mengungkapkan kembali hasil penelitian dalam bentuk kalimat. Pembahasan yang lengkap dan menyeluruh lebih disukai dari pada pembahasan yang tidak tuntas. Naskah telaah pustaka tanpa sub judul Bahan dan Metode, serta Hasil dan Pembahasan. **Kesimpulan** (*Conclusion*) sebaiknya tetap diberikan, meskipun biasanya sudah terungkap pada Hasil dan Pembahasan. **Ucapan terima kasih** (*Acknowledgments*) apabila diperlukan ditulis secara singkat. **Gambar dan Tabel** maksimum 3 halaman, dapat dibuat dengan tinta cina atau printer laser. Judul gambar ditulis di bawah gambar, sedangkan judul tabel ditulis di atas tabel. Foto dicetak pada kertas *glossy* dan diberi keterangan. Gambar berwarna dapat diterima apabila informasi ilmiah dalam naskah dapat hilang tanpa gambar tersebut. Setiap gambar dan foto sebaiknya menyertakan file digital. Penulis dianjurkan

menyertakan foto atau gambar untuk sampul depan, meskipun tidak dimuat dalam naskah sendiri. **Tidak ada lampiran**, semua data atau analisis data dimasukkan dalam Hasil dan Pembahasan.

Pustaka dalam naskah ditulis dalam bentuk nama belakang penulis dan tahun. Pada kalimat yang diacu dari beberapa pustaka. Naskah yang ditulis oleh dua penulis, maka nama keduanya disebutkan, sedang naskah yang ditulis oleh tiga penulis atau lebih, maka hanya nama penulis pertama ditulis diikuti *et al.* atau dkk., misalnya: Sprent dan Sprent (1990) atau (Suranto *et al.*, 1998; Baker and Manwell, 1991; Smith 1982a, b). Pada sitasi bertingkat digunakan kata *cit* atau dalam, misalnya (Gyorgy, 1991 *cit* Coward, 1999) atau Gyorgy (1991, dalam Coward, 1999).

Daftar Pustaka diketik dengan spasi ganda. Sitasi mengikuti CBE-ELSE-Vancouver style dengan modifikasi sebagai berikut:

Jurnal:

Suranto, S., K.H. Gough, D.D. Shukla, and C.K. Pallaghy. 1998. Coat protein sequence of Krish-infected strain of Johnson-grass mosaic potyvirus. *Archives of Virology* 143: 1015-1020.

Buku:

Sprent, J.I. and P. Sprent. 1990. *Nitrogen Fixing Organisms: Pure and Applied Aspects*. London: Chapman and Hall.

Abstrak:

Liu, Q., S. Salih, J. Ingersoll, R. Meng, L. Owens, and F. Hammerschlag. 2000. Response of transgenic 'Royal Gala' apple (*Malus x domestica* Borkh.) shoots, containing the modified cecropin MB39 gene to *Erwinia amylovora* [084]. *Abstracts of 97th Annual International Conference of the American Society for Horticultural Science*. Lake Buena Vista, Fla., 23-26 July 2000.

Abstrak:

Liu, Q., S. Salih, J. Ingersoll, R. Meng, L. Owens, and F. Hammerschlag. 2000. Response of transgenic 'Royal Gala' apple (*Malus x domestica* Borkh.) shoots, containing the modified cecropin MB39 gene to *Erwinia amylovora* [084]. *Abstracts of 97th Annual International Conference of the American Society for Horticultural Science*. Lake Buena Vista, Fla., 23-26 July 2000.

Prosiding:

Alikodra, H.S. 2000. Keanekaragaman hayati bagi pembangunan daerah otonom. *Dalam*: Setyawan, A.D. dan Sutarno (ed.). *Menuju Taman Nasional Gunung Lawu, Prosiding Semiloka Nasional Konservasi Biodiversitas untuk Perlindungan dan Penyelamatan Plasma Nutfah di Pulau Jawa*. Surakarta, 17-20 Juli 2000.

Skripsi, Tesis, Disertasi:

Purwoko, T. 2001. *Biotransformasi Isoflavon oleh Rhizopus oryzae UICC 524 dan Aktivitas Antioksidan Isoflavon Aglikon dari Tempe terhadap Oksidasi Minyak Kedelai* [Tesis]. Jakarta: Universitas Indonesia.

Informasi dari Internet:

Rosauer, D. 1998. *Forest Disturbance and Succession*. <http://www.anu.edu.au/Forestry/silviculture/daniel/chapter1/1.1.html>

Naskah publikasi "*in press*" dapat disitasi dan dicantumkan dalam daftar pustaka. "Komunikasi pribadi" dapat disitasi, tetapi tidak dapat dicantumkan dalam daftar pustaka. Penelitian yang tidak dipublikasikan atau sedang dalam tahap pengajuan publikasi tidak dapat disitasi.

Beberapa catatan tambahan. Naskah diketik tanpa tanda hubung (-), kecuali kata ulang. Penggunaan huruf "l" (el) untuk "1" (satu) atau "O" (oh) untuk "0" (nol) perlu dihindari. Simbol α , β , χ , dan lain-lain dimasukkan melalui fasilitas insert, bukan mengubah jenis huruf. Kata-kata dan tanda baca sesudahnya tidak diberi spasi.

Kemajuan Naskah. Pemberitahuan naskah dapat diterima atau ditolak akan diberitahukan sekitar satu bulan setelah pengiriman. Naskah dapat ditolak apabila materi yang dikemukakan tidak sesuai dengan misi jurnal, kualitas materi rendah, format tidak sesuai, gaya bahasa terlalu rumit, terjadi ketidakjujuran keaslian penelitian, dan korespondensi tidak ditanggapi. Penulis atau penulis pertama pada naskah kelompok akan mendapatkan satu eksemplar jurnal yang memuat tulisannya selambat-lambatnya sebulan setelah naskah diterbitkan. Penulis akan kembali mendapatkan satu eksemplar jurnal nomor penerbitan berikutnya.

PENTING: Penulis atau para penulis dalam naskah kelompok setuju memindahkan hak cipta (*copyright*) naskah yang diterbitkan *Biofarmasi, Journal of Pharmacological and Biological Sciences* kepada Jurusan Biologi FMIPA UNS Surakarta. Penulis tidak lagi diperkenankan menerbitkan naskah secara utuh tanpa ijin penerbit. Penulis atau pihak lain diperkenankan memperbanyak naskah dalam jurnal ini selama tidak untuk tujuan komersial. Untuk penemuan baru, penulis disarankan mengurus hak patennya sebelum mempublikasikan dalam jurnal ini.

Pertumbuhan, Kadar Klorofil-Karotenoid, Saponin, Aktivitas Nitrat Reduktase Anting-anting (*Acalypha indica* L.) pada Konsentrasi Asam Giberelat (GA₃) yang Berbeda 1-8

- DWI KARSIWI PENI, SOLICHATUN, ENDANG ANGGARWULAN

Pertumbuhan Kalus dan Kandungan Minyak Atsiri Nilam (*Pogostemon cablin* (Blanco) Bth.) dengan Perlakuan Asam α -Naftalen Asetat (NAA) dan Kinetin 9-14

- GUNTUR TRIMULYONO, SOLICHATUN, SOERYA DEWI MARLIANA

Aktifitas Hipoglikemik dan Hipolipidemik Ekstrak Air Daun Bungur (*Lagerstroemia speciosa* [L.] Pers.) terhadap Tikus Diabetik 15-23

- UDHI EKO HERNAWAN, SUTARNO, AHMAD DWI SETYAWAN

Seleksi dan Identifikasi Isolat Cendawan Selulolitik dan Lignoselulolitik dari Limbah Penyulingan Daun Kayu Putih (*Melaleuca leucadendron* L.) dari KPH Gundih, Kabupaten Grobogan 24-28

- BASTIYAH DEWI ZUMROTININGRUM, ARI SUSILOWATI, WIRYANTO

Optimasi Produksi Xilitol dengan Variasi Konsentrasi Hidrolisat Hemiselulosa Bagase oleh *Candida tropicalis* 29-34

- WAHYUNI, ARI SUSILOWATI, RATNA SETYANINGSIH

Pertumbuhan dan Produksi Saponin Kultur Kalus *Talinum paniculatum* Gaertn. pada Variasi Penambahan 2,4-diklorofenoksi asetat dan kinetin 35-43

- DIAN PRAMITA WARDANI, SOLICHATUN, AHMAD DWI SETYAWAN

