

**PENGARUH PEKTIN TERHADAP KANDUNGAN KUERSETIN  
PADA KALUS TEH (*Camellia sinensis* L. O.Kuntze)**

**SKRIPSI**

oleh:  
**Miftahul Farihah**  
**0410910032**

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA**



**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2008**

**PENGARUH PEKTIN TERHADAP KANDUNGAN  
KUERSETIN PADA KALUS TEH  
(*Camellia sinensis* L. O.Kuntze)**

**SKRIPSI**

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh selar Sarjana Sains  
dalam bidang biologi

oleh:  
**Miftahul Farihah**  
**0410910032**

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA**



**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2008**



HALAMAN PENGESAHAN

PENGARUH PEKTIN TERHADAP KANDUNGAN  
KUERSETIN PADA KALUS TEH  
(*Camellia sinensis* L. O.Kuntze)

oleh:  
**Miftahul Farihah**  
**0410910032-91**

Telah dipertahankan di depan Majelis Penguji  
pada tanggal 23 Desember 2008  
untuk memenuhi syarat memperoleh gelar Sarjana Sains dalam  
bidang biologi

Pembimbing I

Pembimbing II

Dr. Wahyu Widoretno, MSi.  
NIP. 131 837 696

Ir. Retno Mastuti, MAg.Sc. DA.G.Sc.  
NIP. 131 879 408

Mengetahui,  
Ketua Jurusan Biologi  
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

Dr. Sri Rahayu, MKes.  
NIP. 131 652 677



**LEMBAR PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Miftahul Fariyah  
NIM : 0410910032-91  
Program Studi : Biologi  
Penulis Skripsi Berjudul:

**PENGARUH PEKTIN TERHADAP KANDUNGAN  
KUERSETIN PADA KALUS TEH  
(*Camellia sinensis* L. O.Kuntze)**

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya sendiri tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di Daftar Pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila di kemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan segala kesadaran.

Malang, 23 Desember 2008

Yang menyatakan,

(MIFTAHUL FARIYAH)  
NIM. 0410910032-91

## PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak dipublikasikan namun terbuka untk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipannya hanya dapat dilakukan seijin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.



## PENGARUH PEKTIN TERHADAP KANDUNGAN KUERSETIN PADA KALUS TEH (*Camellia sinensis* L. O.Kuntze)

Miftahul Fariyah, Wahyu Widoretno, Retno Mastuti  
Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam.  
Universitas Brawijaya, Malang, 2008.

### ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian pektin terhadap pertumbuhan kalus dan pengaruh pektin terhadap kandungan flavonoid serta kandungan kuersetin pada kalus teh selama 4 dan 8 minggu. Rancangan percobaan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap faktorial yang terdiri dari 2 faktor, yaitu konsentrasi elisitor pektin (0, 50, 75 dan 100 ppm) dan lama kultur (4 dan 8 minggu). Induksi kalus dilakukan dengan cara mengkultur eksplan daun teh dalam medium MS + kinetin 1 ppm + 2,4-D 1 ppm. Elisitasi dilakukan dengan mengkultur kalus pada medium induksi kalus dengan penambahan elisitor pektin selama 4 dan 8 minggu. Setelah itu ditimbang berat basah, berat kering, serta dianalisis kandungan flavonoid dan kuersetinnya. Analisis kandungan flavonoid dan kuersetin dilakukan dengan metode spektrofotometri dan Kromatografi Lapis Tipis. Data yang diperoleh dianalisis dengan uji ANOVA yang dilanjutkan dengan uji Duncan ( $\alpha$  0,05). Penambahan pektin hingga konsentrasi 100 ppm tidak berpengaruh terhadap pertumbuhan kalus teh, meskipun ada kecenderungan peningkatan berat basah dibandingkan dengan kontrol. Peningkatan pertumbuhan kalus teh pada medium kontrol dan medium perlakuan dengan penambahan pektin secara signifikan mulai tampak setelah 4 minggu kultur dan pertumbuhan kalus teh tersebut selama 8 minggu kultur masih dalam fase eksponensial. Konsentrasi elisitor pektin tidak berpengaruh terhadap kandungan flavonoid dan kuersetin kalus teh meskipun ada kecenderungan peningkatan kandungan flavonoid dan kuersetin kalus teh. Kandungan flavonoid dan kuersetin kalus teh yang dikultur selama 4 minggu lebih tinggi daripada kandungan flavonoid dan kuersetin kalus teh yang dikultur selama 8 minggu, tetapi hal tersebut tidak signifikan pada kandungan flavonoid kalus teh.

Kata kunci :*Camellia sinensis*, Elisitor, Flavonoid, Pektin, Kuersetin.

## THE EFFECT OF PECTIN ON THE QUERCETIN CONTENT IN CALLUS OF TEA (*Camellia sinensis* L. O.Kuntze)

Miftahul Farihah, Wahyu Widoretno, Retno Mastuti  
Departement of Biology, Faculty Mathematics and Natural Sciences,  
Brawijaya University, Malang, 2008.

### ABSTRACT

The aim of this research were to investigate the effect of elicitor pectin and the length of culture on growth, flavonoid and quercetin content of tea callus at 4 and 8 weeks old. The research was designed using Randomize Complete Factorial Design with 2 factors. The first factor was concentration of pectin elicitor (0, 50, 75, dan 100 ppm), the second factor was the length of culture (4 and 8 weeks). Callus induction was done by culturing tea leaf explants on MS medium + 1 ppm kinetin + 1 ppm 2,4-D. Elicitation was done by culturing the callus on medium induction supplemented with pectin at various concentration during 4 and 8 weeks. Growth of tea callus was measured by weighing callus fresh weight every 2 weeks during 8 weeks. Flavonoid and quercetin content was analyzed by spectrophotometry and Thin Layer Chromatography (TLC). Data were analyzed by using ANOVA and allowed by Duncan test ( $\alpha$  0,05). The result of this research showed that the length of culture significantly affected callus growth and callus still in exponential phase at 8 weeks. Pectin at various concentration did not significantly affect flavonoid and quercetin content. Flavonoid and quercetin content of callus cultured was higher at 4 weeks than 8 weeks, but not significant in flavonoid content.

Key word : *Camellia sinensis*, Elicitor, Flavonoid, Pectin, Quercetin.

## KATA PENGANTAR

Assalamualaikum Wr, Wb,

Bismillahirrohmanirrohim, Puji syukur ke hadirat Allah SWT, Tuhan seru sekalian alam, yang dengan petunjuk, bimbingan, rahmat, dan karuniaNya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul **“Pengaruh Pektin terhadap Kandungan Kuersetin pada Kalus Teh (*Camelia sinensis* L. O.Kuntze)”**. Sholawat serta salam semoga tetap tercurahkan kepada junjungan kita Nabi besar Muhammad SAW beserta seluruh ummatNya.

Penulisan skripsi ini merupakan salah satu syarat guna memperoleh gelar Sarjana Sains dalam bidang Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang. Penelitian yang panjang dengan penuh perjuangan dan kesabaran tidak luput dari peran serta semua pihak yang telah membantu terselesaikannya skripsi ini. Maka dari itu penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada :

1. Dr. Wahyu Widoretno, MSi dan Ir. Retno Mastuti, MAg.Sc. DAg.Sc selaku Dosen Pembimbing I dan II yang telah banyak memberikan bimbingan dan pengarahan selama penyelesaian skripsi ini.
2. Dra. Nunung Harijati, MS, PhD., Rodliyati Azrianingsih, MSc, PhD., dan Dr. Sri Widiyarti, MS selaku Dosen Penguji yang telah banyak meberikan saran dan kritik untuk lebih baiknya skripsi ini.
3. Dr. Sri Rahayu, MKes. selaku Ketua Jurusan Biologi dan para Bapak / Ibu dosen pengajar serta staf TU Jurusan Biologi.
4. Ayah dan Ibu serta kakak dan adik-adikku yang telah banyak meberikan doa dan dukungannya dalam segala hal terutama dalam proses penyelesaian skripsi ini.
5. Teman-teman ‘QRT crew’ (Asih, Nanik, dan Asti) atas segala perjuangan yang kita lakukan bersama.
6. Teman-teman Lab.FKM (Shinta M., Nurul, Deby, Elly, Fida, Elok, Evit) atas segala bantuan dan dukungannya.
7. Rizki Mustafani yang telah banyak membantu dengan penuh kesabaran dan kesetiaannya untuk terselesaikannya skripsi ini.
8. Teman-teman biologi ‘angkatan 2004’ dan semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa dalam penulisan skripsi ini masih banyak kekurangan. Oleh sebab itu, penulis sangat mengharap kritik dan saran guna kesempurnaan skripsi ini. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi penulis dan semua pihak.

Wassalamu'alaikum Wr. Wb.

Malang, 2008

Penulis



DAFTAR ISI

Halaman

**HALAMAN JUDUL** ..... i  
**HALAMAN PENGESAHAN** ..... ii  
**LEMBAR PERNYATAAN** ..... iii  
**ABSTRAK** ..... v  
**ABSTRACT** ..... vi  
**KATA PENGANTAR** ..... vii  
**DAFTAR ISI** ..... ix  
**DAFTAR GAMBAR** ..... xi  
**DAFTAR LAMPIRAN** ..... xii

**BAB I PENDAHULUAN**

1.1. Latar Belakang ..... 1  
 1.2. Rumusan Masalah ..... 2  
 1.3. Tujuan ..... 2  
 1.4. Manfaat ..... 3

**BAB II TINJAUAN PUSTAKA**

2.1. Tinjauan Umum Teh (*Camellia sinensis* L.O. Kuntze) ..... 4  
 2.2. Produksi Metabolit Sekunder Melalui Teknik Kultur Jaringan ..... 5  
 2.3. Elisitasi Meningkatkan Kandungan Metabolit Sekunder ..... 7  
 2.4. Pektin sebagai Elisitor ..... 8  
 2.5. Struktur dan Biosintesis Flavonoid dan Kuersetin ..... 10

**BAB III METODE PENELITIAN**

3.1. Waktu dan Tempat ..... 16  
 3.2. Rancangan Penelitian ..... 16  
 3.3. Tahapan Penelitian ..... 17  
     3.3.1. Pembuatan Media ..... 17  
     3.3.2. Induksi dan Pemeliharaan Kalus ..... 17  
     3.3.3. Elisitasi ..... 18  
     3.3.4. Analisis Kandungan Kuersetin ..... 18  
 3.4. Analisis Data ..... 20

**BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN**

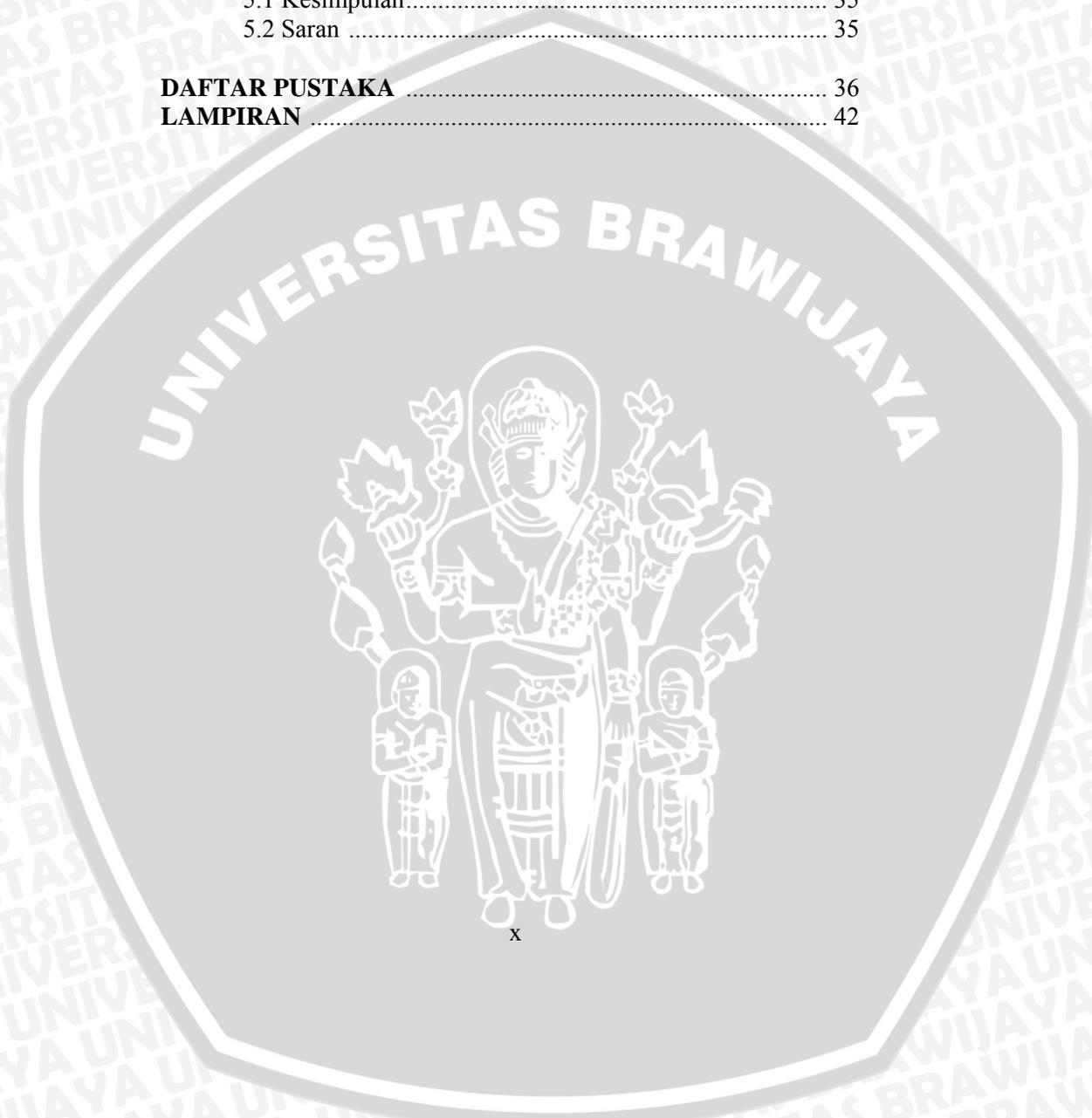
4.1. Pengaruh Pektin terhadap Pertumbuhan Kalus Teh .. 21  
 4.2. Pengaruh Elisitor Pektin terhadap Kandungan  
 Flavonoid dan Kuersetin pada Kalus Teh ..... 27  
 4.3. Hubungan antara Berat Kering dengan Kndungan  
 Flavonoid dan Kuersetin Kalus Teh ..... 32

**BAB V PENUTUP**

5.1 Kesimpulan..... 35  
 5.2 Saran ..... 35

**DAFTAR PUSTAKA ..... 36**

**LAMPIRAN ..... 42**



**DAFTAR GAMBAR**

Halaman

Gambar 2.1 Struktur kimia pektin ..... 9

Gambar 2.2 Struktur kompleks pektin ..... 10

Gambar 2.3 Stuktur dasar flavonoid ..... 11

Gambar 2.4 Pembagian kelas flavonoid ..... 12

Gambar 2.5 Bioseintesis flavonoid ..... 13

Gambar 2.6 Struktur kimia kuersetin ..... 14

Gambar 2.7 Biosintesis kuersetin ..... 15

Gambar 4.1 Pertumbuhan eksplan daun teh pada media induksi kalus ..... 21

Gambar 4.2 Pengaruh beberapa macam konsentrasi pektin terhadap pertumbuhan kalus teh selama 8 minggu ..... 23

Gambar 4.3 Kurva pertumbuhan kalus teh selama 8 minggu pada medium dengan penambahan beberapa konsentrasi elisitor pektin ..... 24

Gambar 4.4 Pengaruh elisitor pektin terhadap berat basah dan berat kering kalus selama 4 dan 8 minggu ..... 26

Gambar 4.5 Hasil KLT senyawa kuersetin ekstrak kalus teh hasil elisitasi dengan beberapa konsentrasi pektin selama 4 dan 8 minggu ..... 28

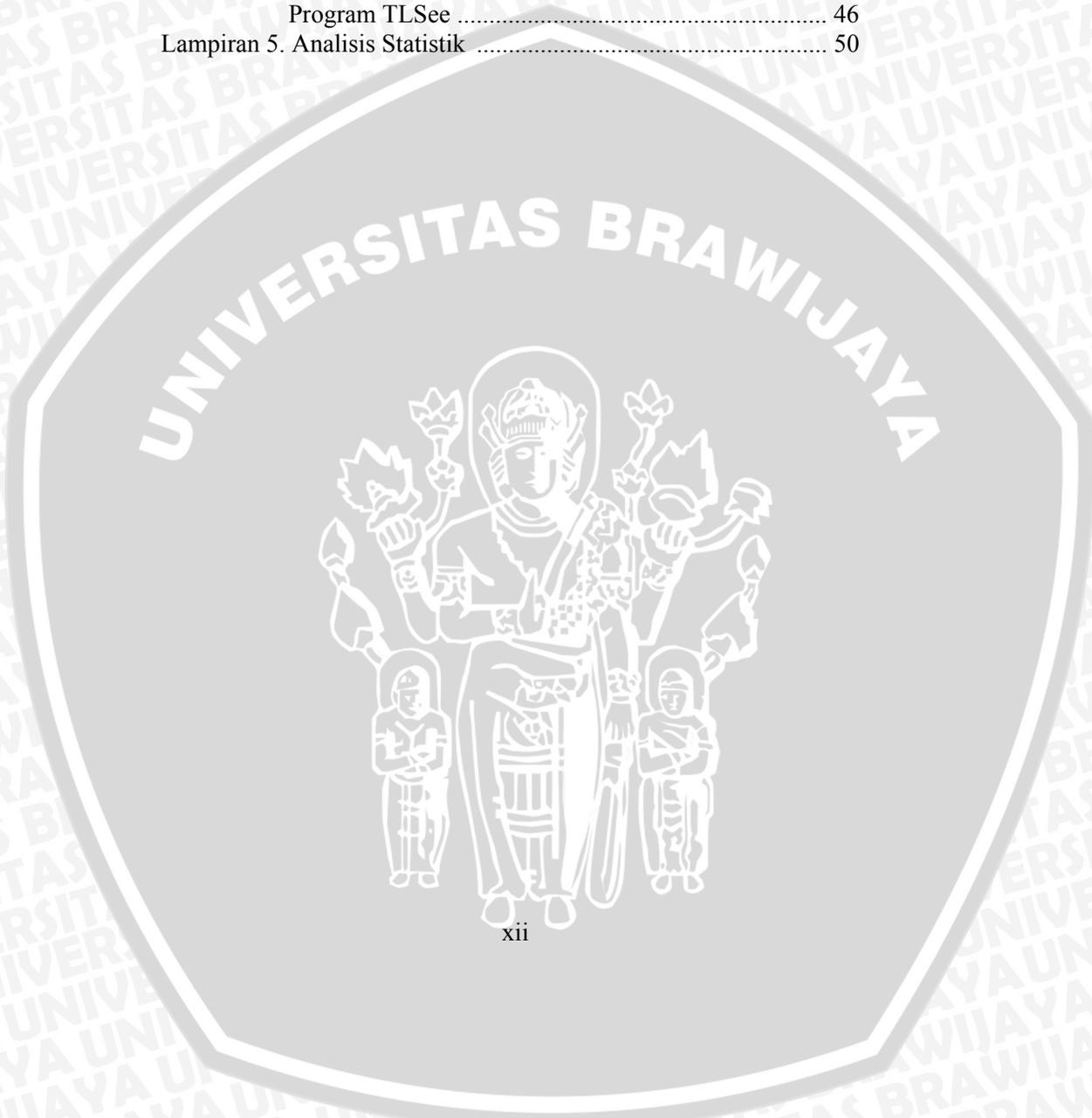
Gambar 4.6 Pengaruh pektin terhadap kandungan flavonoid dan kuersetin pada kalus teh ..... 29

Gambar 4.7 Hubungan antara berat kering dengan kandungan flavonoid, berat kering dengan kandungan kuersetin, dan kandungan flavonoid dengan kandungan kuersetin pada kalus teh selama 4 dan 8 minggu ..... 33



## DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Komposisi Media Induksi dan Media Elisistasi .....	42
Lampiran 2. Pengaruh Pektin terhadap Pertumbuhan, Berat Basah, dan Berat Kering Kalus Teh selama 8 Minggu .....	43
Lampiran 3. Pengaruh Pektin terhadap Kandungan Flavonoid dan Kuersetin pada Kalus Teh .....	44
Lampiran 4. Hasil Analisis Kandungan Kuersetin dengan Program TLSee .....	46
Lampiran 5. Analisis Statistik .....	50



## BAB I PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Teh (*Camellia sinensis* L.O. Kunzte) merupakan minuman yang sudah sangat dikenal di dunia ini. Teh dapat juga dikatakan sebagai minuman kesehatan karena memiliki banyak manfaat bagi kesehatan diantaranya adalah untuk mencegah terjadinya kanker (Pambudi, 2000). Berdasarkan hasil survei yang dilakukan oleh Whin (2005) diketahui bahwa penyakit kanker jumlah penderitanya selalu meningkat dari tahun ke tahun dan menjadi penyebab kematian nomor satu di dunia ini.

Tuminah (1999) menyatakan bahwa penyakit kanker dapat dicegah dengan pemberian zat antioksidan yang dapat memberi perlindungan terhadap kanker melalui mekanisme-mekanisme tertentu berdasarkan sifat antioksidannya. Unsur mikro elemen yang terkandung dalam teh seperti polifenol flavonoid berkhasiat sebagai antioksidan. Teh juga mengandung asam-asam amino, terutama tanin yang dapat meningkatkan kemampuan tubuh untuk melawan infeksi (Pambudi, 2000). Kandungan polifenol kuersetin dalam teh bersifat sebagai senyawa antikanker.

Kuersetin merupakan antioksidan dari golongan flavonoid dengan kekuatan 100 kali lebih tinggi daripada vitamin C dan 25 kali dari vitamin E yang juga merupakan antioksidan potensial. Kuersetin berfungsi sebagai senyawa antikanker dengan cara menghambat kerja enzim isomerase DNA sel kanker yang berperan dalam proses perbanyakan dan peningkatan keganasan kanker (Olthof dkk., 2000). Senyawa kuersetin pada umumnya dalam keadaan terikat dengan senyawa gula (Synder, 1993).

Kandungan kuersetin dalam teh berkisar antara 10 – 25 mg/kg teh pada kondisi *in vivo* (Erlund, 2002). Jumlah tersebut dirasa cukup kecil maka diperlukan salah satu alternatif pemecahan untuk menghasilkan senyawa tersebut yakni kondisi *in vitro* dengan metode kultur jaringan. Kultur kalus merupakan salah satu tipe kultur jaringan yang banyak digunakan untuk mempelajari biosintesis metabolit sekunder (Mukarlina dkk., 2005). Metode kultur jaringan memiliki banyak keunggulan diantaranya yaitu dapat dibentuk senyawa bioaktif dalam kondisi terkontrol dan waktu yang relatif

lebih singkat, bebas dari kontaminasi mikroba, tidak bergantung kepada kondisi lingkungan seperti keadaan geografi, iklim dan musim, dan setiap sel dapat diperbanyak untuk menghasilkan senyawa metabolit sekunder tertentu, pertumbuhan sel terawasi dan proses metabolismenya dapat diatur secara rasional (Fitriani, 2003). Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Roberts pada tahun 2007 menunjukkan bahwa dengan teknik kultur jaringan produksi terpenoid pada beberapa tanaman dapat ditingkatkan. Pada tanaman tomat dan bluberry kandungan flavonoid dapat ditingkatkan sekitar 3 – 7 % pada kondisi kultur sel (Lila dkk., 2005).

Senyawa metabolit sekunder merupakan hasil dari bentuk aksi pertahanan tanaman terhadap patogen seperti fungi, bakteri, serangga dan virus (Benhamou, 1996). Penambahan elisitor dapat menginduksi dan meningkatkan pembentukan metabolit sekunder (Namdeo, 2007). Elisitor terdiri atas dua kelompok, yaitu elisitor abiotik dan elisitor biotik. Elisitor abiotik dapat berasal dari senyawa anorganik, radiasi secara fisik seperti ultraviolet, logam berat dan deterjen. Elisitor biotik dapat dikelompokkan dalam elisitor endogen dan elisitor eksogen. Pektin yang termasuk polisakarida termasuk sebagai elisitor biotik diketahui dapat meningkatkan produksi fitoaleksin pada kultur sel tanaman kedelai (Angelova dkk., 2006); (Nothnagel dkk., 1982), selain itu juga dapat meningkatkan kandungan ajmalisin pada kultur akar *Catharantus roseus* (Mukarlina dkk., 2006). Berdasarkan hasil penelitian Yamamoto dkk. (2000) diketahui bahwa golongan polisakarida termasuk pektin dan manan dapat menstimulasi produksi prenylated flavanone pada kultur kalus *Sophora flavescens*.

Lamanya waktu kultur dapat mempengaruhi produksi metabolit sekunder yang dihasilkan oleh tanaman tertentu. Pada umumnya dalam kultur kalus diperlukan waktu sekitar 1 sampai 2 bulan untuk memproduksi metabolit sekunder disaat selnya telah mencapai pertumbuhan yang maksimal. Pada penelitian yang dilakukan oleh Mathius dkk. (2004), kalus kina mencapai pertumbuhan maksimal untuk menghasilkan metabolit sekunder alkaloid kinolin setelah dikultur selama 8 minggu. Pada kalus *Catharanthus roseus* yang dikultur selama 8 minggu pertumbuhannya telah mencapai fase stasioner dan mampu menghasilkan ajmalisin (Fitriani, 2003).

Berdasarkan latar belakang tersebut maka pada penelitian ini akan dilakukan pengamatan mengenai pengaruh pemberian pektin terhadap kandungan kuersetin pada kultur kalus teh (*Camellia sinensis* L.O. Kuntze) selama 4 dan 8 minggu.

### 1.2 Rumusan Masalah

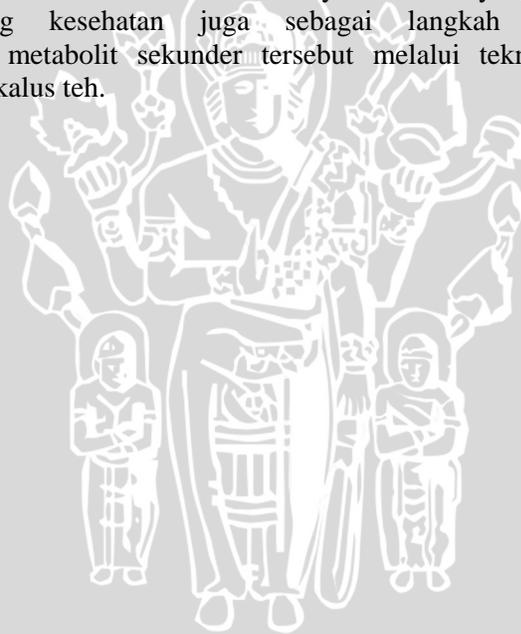
Rumusan masalah yang diambil pada penelitian ini adalah bagaimana pengaruh pemberian pektin terhadap pertumbuhan kalus dan pengaruh pemberian pektin terhadap kandungan flavonoid serta kandungan kuersetin kalus teh selama 4 dan 8 minggu.

### 1.3 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian pektin terhadap pertumbuhan kalus dan mengetahui pengaruh pemberian pektin terhadap kandungan flavonoid serta kandungan kuersetin kalus teh selama 4 dan 8 minggu.

### 1.4 Manfaat

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberi manfaat untuk meningkatkan produksi flavonoid khususnya kuersetin yang berguna dalam bidang kesehatan juga sebagai langkah alternatif memproduksi metabolit sekunder tersebut melalui teknik kultur jaringan pada kalus teh.



## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Tinjauan Umum Teh (*Camellia sinensis* L. O.Kuntze)

Tanaman teh umumnya ditanam di perkebunan, dipanen secara manual, dan dapat tumbuh pada ketinggian 200 - 2.300 m di atas permukaan laut. Ada dua kelompok varietas teh yang terkenal, yaitu var. *assamica* yang berasal dari India dan var. *sinensis* yang berasal dari Cina. Varietas *assamica* daunnya agak besar dengan ujung yang runcing, sedangkan varietas *sinensis* daunnya lebih kecil dan ujungnya agak tumpul. Batang tegak, berkayu, bercabang-cabang, ujung ranting dan daun muda berambut halus. Daun tunggal, bertangkai pendek, letak berseling, helai daun kaku seperti kulit tipis, bentuknya elips memanjang, ujung dan pangkal runcing, tepi bergerigi halus, pertulangan menyirip, panjang 6 - 18 cm, lebar 2 - 6 cm, warnanya hijau, permukaan mengkilat. Bunga di ketiak daun, tunggal atau beberapa bunga bergabung menjadi satu, berkelamin dua, garis tengah 3 - 4 cm, warnanya putih cerah dengan kepala sari berwarna kuning, berbau harum. Buahnya buah kotak, berdinding tebal, pecah menurut ruang, masih muda hijau setelah tua cokelat kehitaman. Pucuk dan daun teh muda adalah bagian tanaman yang digunakan untuk pembuatan minuman teh. Perbanyakan teh dapat dilakukan dengan biji, stek, atau cangkokan (Kongkow, 2007).

Berdasarkan penanganan pasca panen, tanaman yang termasuk dalam famili *Camelliaceae* ini dibagi menjadi 3 macam, yaitu: teh hijau, teh hitam, dan teh oolong. Teh hijau diperoleh tanpa proses fermentasi. Daun teh diberi perlakuan panas untuk menon-aktifkan enzim yang terdapat di dalamnya. Pemanasan ini dapat dilakukan dengan 2 cara, yaitu dengan udara kering dan pemanasan basah dengan uap panas. Pada pemanasan dengan suhu 85°C selama 3 menit, aktivitas enzim polifenol oksidase tinggal 5,49%. Pemanggangan secara tradisional dilakukan pada suhu 100-200°C. Sedangkan pemanggangan dengan mesin suhunya antara 220-300°C. Pemanggangan ini bertujuan memberikan rasa dan aroma yang lebih kuat dibandingkan dengan metode pemberian uap panas. Di sisi lain, keuntungan memakai cara uap panas adalah warna teh dan seduhannya hijau terang. Teh hitam, diperoleh melalui proses fermentasi yang menggunakan enzim yang terdapat dalam daun teh

itu sendiri (enzim polifenol oksidase). Prosesnya dimulai dengan melayukan daun teh tersebut pada palung pelayu, kemudian digiling sehingga sel-sel daunnya rusak. Selanjutnya dilakukan fermentasi pada suhu antara 22-28°C, dengan kelembaban sekitar 90%. Lamanya fermentasi sangat menentukan kualitas hasil akhir, biasanya dilakukan 2-4 jam. Baru kemudian dilakukan pengeringan sampai kandungan teh kering mencapai 4-6%. Teh oolong, diproses secara semifermentasi dan dibuat dengan bahan baku khusus, yaitu varietas tertentu yang memberikan aroma khusus. Prosesnya daun teh dilayukan lebih dahulu selama 3-7 menit untuk inaktivasi enzim, langkah selanjutnya adalah penggulungan dan pengeringan (Chalimah, 2004).

Komponen aktif yang terkandung dalam daun teh segar, baik yang volatile maupun yang nonvolatile antara lain adalah polifenol (10 - 25%), methylxanthines, asam amino, peptida, *tannic acids* (9 - 20%), vitamin C (150 - 250 mg%), vitamin E (25 - 70 mg%), vitamin K (300 - 500 IU/g), carotene (13 - 20%), kalium (1795 mg%), magnesium (192 mg%), mangan (300 - 600 ug/ml), fluor (0,1 - 4,2 mg/L), zinc (5,4 mg%), selenium (1,0 - 1,8 ppm%), copper (0,01 mg%), iron (33 mg%), calcium (7 mg%), dan caffein (45 - 50 mg%) (Pambudi, 2000).

Kandungan flavonoid dalam teh merupakan antioksidan yang bersifat antikarsinogenetik dan hipokolesterolemik. Atau dikenal sebagai minuman yang bersifat sebagai penangkal zat racun dalam tubuh dan masalah-masalah yang berhubungan dengan kolesterol (Chalimah, 2004). Daun teh berguna untuk mengatasi sakit kepala, diare, darah tinggi, kencing manis, mengurangi terbentuknya karang gigi, infeksi saluran cerna, dan dapat digunakan sebagai penyubur dan penghitam rambut (Kongkow, 2007).

## **2.2 Produksi Metabolit Sekunder Melalui Teknik Kultur Jaringan**

Metabolit sekunder merupakan hasil metabolisme yang memiliki karakteristik khusus untuk setiap makhluk hidup dan dibentuk melalui jalur khusus dari metabolit primer seperti karbohidrat, lemak, asam amino. Metabolit sekunder dibentuk untuk meningkatkan daya adaptasi dan meningkatkan pertahanan diri (Herbert, 1995), dan juga

merupakan sumber senyawa yang mempunyai aktivitas farmatikal yang penting (Rao, 2002).

Salah satu strategi untuk meningkatkan metabolit sekunder adalah melalui teknik kultur jaringan. Teknik ini merupakan teknik mengisolasi bagian tanaman seperti daun, mata tunas, akar, dan bagian lainnya lalu menumbuhkan bagian-bagian tersebut dalam media buatan yang kaya akan nutrisi dan zat pengatur tumbuh secara aseptik dalam wadah tertutup yang tembus cahaya sehingga bagian tanaman dapat memperbanyak diri dan bergenerasi menjadi tanaman lengkap (Herbert, 1995). Sel tumbuhan memiliki sifat totipotensi, yaitu apabila sel tersebut diletakkan pada lingkungan yang sesuai akan dapat tumbuh menjadi tanaman yang sempurna (Chawla, 2002). Winata (1992) menyatakan bahwa pertumbuhan suatu tanaman meliputi tumbuh dan berkembangnya sel-sel atau jaringan tanaman. Proses tumbuh dan berkembang tersebut biasanya berjalan bersamaan selama pertumbuhan, dan melalui teknik kultur jaringan dapat diamati proses tersebut yang diawali dengan pembentukan masa sel yang belum berdiferensiasi (kalus). Kalus adalah suatu kumpulan sel amorf yang terjadi dari sel-sel yang membelah diri secara terus-menerus dalam kondisi *in vitro*. Kalus dapat diperoleh dari bagian tanaman seperti akar, batang, dan daun. Bila kalus ini mengalami regenerasi maka akan terbentuk tunas dan akar yang akhirnya akan terbentuk tanaman lengkap.

Penambahan senyawa auksin dan sitokinin yang tepat dalam media kultur jaringan mampu mempercepat multiplikasi sel jaringan beberapa tumbuhan. Kalus merupakan massa amorf yang terdiri atas sel-sel parenkim yang berasal dari proliferasi jaringan induk, tidak terorganisasi dan terdiri dari sel-sel yang sedang aktif membelah. Kalus terbentuk pada ujung potongan daun, batang atau akar sebagai respon adanya pelukaan. Penambahan hormon sitokinin dan auksin yang seimbang mampu menginduksi pertumbuhan kalus (Chawla, 2002).

Penerapan kultur jaringan tumbuhan mempunyai beberapa keuntungan dibandingkan dengan penggunaan konvensional. Keuntungan-keuntungan tersebut, antara lain (a) dapat dibentuk senyawa bioaktif dalam kondisi terkontrol dan waktu yang relatif lebih singkat, (b) bebas dari kontaminasi mikroba, (c) setiap sel dapat diperbanyak untuk menghasilkan senyawa metabolit sekunder

tertentu, (d) pertumbuhan sel terawasi dan proses metabolismenya dapat diatur secara rasional, (e) tidak bergantung kepada kondisi lingkungan seperti keadaan geografi, iklim dan musim (Fitriani, 2003).

### 2.3 Elisitasi Meningkatkan Kandungan Metabolit Sekunder

Produksi metabolit sekunder pada tanaman sebagian besar adalah sebagai hasil dari mekanisme pertahanan terhadap serangan patogen. Elisitasi merupakan salah satu cara yang paling efektif untuk meningkatkan produksi senyawa metabolit sekunder (Angelova dkk., 2006). Elisitasi merupakan proses penambahan elisitor pada sel tumbuhan dengan tujuan untuk menginduksi dan meningkatkan pembentukan metabolit sekunder (Namdeo, 2007). Elisitor bertindak sebagai penginduksi mekanisme aksi pertahanan tanaman. Adapun mekanisme terjadinya pertahanan tanaman dapat digambarkan sebagai berikut yaitu saat tanaman dan patogen berinteraksi maka akan menghasilkan susunan beberapa metabolit yang berkontribusi untuk melepaskan sinyal *pectic oligomer* (elisitor endogen). Ikatan antara elisitor dengan reseptor membran menyebabkan membran mengalami depolarisasi dan menjadikan *second messenger* teraktivasi yang akan membawa sinyal ke nukleus sehingga dihasilkan *gen defense*, enzim metabolit sekunder, PR protein, dan inhibitor protease (Benhamou, 1996)

Elisitor terdiri atas dua kelompok, yaitu elisitor abiotik dan elisitor biotik. Elisitor abiotik dapat berasal dari senyawa anorganik, radiasi secara fisik seperti ultraviolet, logam berat dan deterjen. Elisitor biotik dapat dikelompokkan dalam elisitor endogen dan elisitor eksogen. Elisitor endogen umumnya berasal dari bagian tumbuhan itu sendiri, seperti bagian dari dinding sel (oligogalakturonat) yang rusak oleh suatu serangan patogen melalui aktivitas enzim hidrolisis atau membran plasma yang mengalami kerusakan karena luka. Elisitor eksogen berasal dari dinding jamur misalnya kitin atau glukukan. Selain itu dapat berupa suatu senyawa yang disintesis oleh patogen misalnya protein (Angelova dkk., 2006;Robins, 2004).

Beberapa penelitian telah membuktikan bahwa metode elisitasi dapat meningkatkan kandungan metabolit sekunder pada tanaman tertentu. Kapsaicin pada kultur sel *Capsicum frutescens* dapat

repository.ub.ac

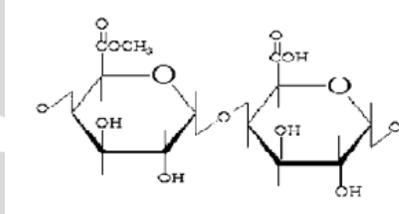
ditingkatkan dengan penambahan kalsium dua kali media MS, jumlah kapsaicin yang diperoleh lebih tinggi (30.7 mg/kultur) daripada kontrol (26.3 mg/kultur) (Sudha dan Ravishankar, 2002). Pemberian elisitor yang berasal dari jamur *Verticillium dahliae* Kleb 80 µg BK/ml mampu meningkatkan kandungan gospol dalam kultur akar kapas sebesar 4,427 mg/g BK pada waktu panen hari ke-2 setelah elisitasi dengan persentase peningkatan mencapai 38,39 % (Setiawati, 2006).

Sintesis metabolit sekunder merupakan salah satu fungsi protektif tanaman ketika ada beberapa patogen dengan meningkatkan fitoaleksin. Mekanisme pertahanan tanaman meliputi : 1) deteksi sinyal patogen, 2) aktivasi H<sup>+</sup>-ATPase, 3) peningkatan aliran kalsium ke dalam sel, 4) aktivasi CDPK (*calcium-dependent protein kinase*), 5) aktivasi NADPH oksidase. Radikal oksigen yang aktif dihasilkan oleh NADPH oksidase yang akan mengaktifkan MAP kinase sehingga terjadi peningkatan tingkat ekspresi gen biosintesis metabolit sekunder. Reseptor pada membran plasma menerima sinyal elisitor yang akan mengaktifkan H<sup>+</sup>-ATPase dengan menggunakan G-protein dan fosfatase. Adanya hiperpolarisasi membran menginisiasi aktivasi kalsium channel dan peningkatan kalsium dalam sitoplasma akan menginisiasi aktivasi CDPK kinase yang meregulasi penyusunan NADPH oksidase. Radikal oksigen aktif dan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dihasilkan oleh NADPH oksidase akan mengaktifkan MAP kinase yang memfosforilasi faktor transkripsi dan meningkatkan tingkat ekspresi gen pertahanan, salah satu mekanismenya yaitu aktivasi gen biosintesis fitoaleksin. Aktivasi gen pertahanan juga terjadi melalui kalsium dengan melewati jalur NADPH oksidase (Bulgakov dkk., 2003).

#### 2.4 Pektin sebagai Elisitor

Pektin yang diisolasi dari dinding sel tanaman termasuk dalam kelompok polisakarida yang strukturnya dikarakterisasikan dalam tiga kelompok yaitu homogalacturonan, galacturonans, dan rhamnogalacturonans. Sedangkan struktur dasar pektin adalah tampak pada gambar 2.1 (Albersheim dkk., 2008). Elisitor pektin termasuk dalam elisitor biotik yang dapat diisolasi dari dinding sel primer tanaman maupun dinding sel jamur atau ragi (Namdeo, 2007).

Berdasarkan banyak penelitian, diketahui bahwa elisitor karbohidrat, baik oligosakarida maupun polisakarida mampu meningkatkan produksi metabolit sekunder pada kultur jaringan tanaman (Angelova dkk., 2006). Albersheim dkk. (2008) menyatakan bahwa ada peran spesifik dari elisitor karbohidrat golongan polisakarida untuk meningkatkan produksi fitoaleksin pada kultur sel kedelai. Karakterisasi dari elisitor tersebut tampak satu struktur yang inaktif yakni ikatan residu 3,6-glukopiranosida dengan residu  $\beta$ -glukopiranosida. Pada kenyataannya, elisitor karbohidrat yang aktif dan inaktif hanya tampak sedikit perbedaan dari strukturnya tetapi sangat spesifik struktur elisitor karbohidrat tersebut yang akan berikatan dengan reseptor. Pada ekstrak miselium hanya didapatkan satu elisitor yang aktif dari 150 elisitor yang inaktif.

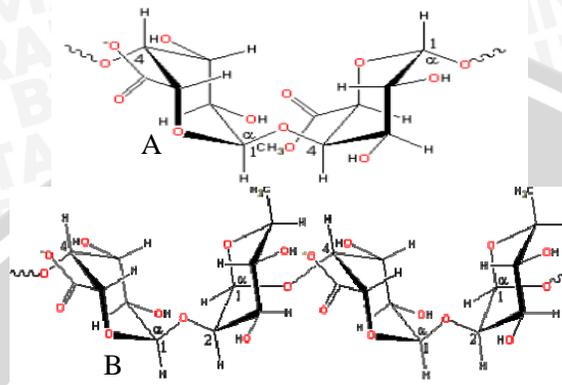


Gambar 2.1 Struktur kimia pektin (Albersheim dkk., 2008).

Pada kultur *Nicotiana tabacum* dan *Eschscholzia californica* diketahui bahwa elisitor pektin tidak mempengaruhi permeabilitas membran tetapi selnya mampu menghasilkan metabolit sekunder fitoaleksin (Angelova dkk., 2006). Elisitor chitosan dan pektin mampu meningkatkan produksi taxol hingga enam kali lipat dari kontrol pada kultur *Taxus canadensis* dan meningkatkan anthraquinon pada kultur *Morinda citrifolia* (Radman dkk., 2000).

Pektin adalah suatu kelompok heterogen dari struktur asam polisakarida yang terdapat terutama dalam dinding sel dan lamela tengah pada buah dan sayuran. Pektin memiliki struktur kompleks yang terdiri dari homopolimer termetilasi sebagian asam poli- $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-galakturonat (*smooth*) (Gambar 2.2.(A)) dan terdapat wilayah *non-gelling rambuty* (Gambar 2.2.(B)) dari perubahan bagian  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2)-L-ramnosil- $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 4)-D-galakturonosil yang mengandung *branch-points* dengan rantai samping netral (1-20 residu) dari L-arabinosa dan D-galaktosa (ramnogalakturonan I).

Pektin dapat juga mengandung rantai samping ramnagalakturonan II yang mengandung residu lainnya seperti D-silosa, L-fukosa, asam D-glukuronat, D-apiosa, asam 3-deoksi-D-mano-2 oktulosonat (Kdo) dan asam 3-deoksi-D-likso-2 heptulosonat (Dha) yang terikat pada daerah asam poli- $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-galakturonat. Pada umumnya, pektin tidak menunjukkan struktur yang pasti. Bentuk residu asam D-galakturonat paling banyak dari molekul, dalam memisahkan daerah 'smooth' dan 'rambuty' (Chaplin 2004).



Gambar 2.2 Struktur kompleks pektin. (A). Wilayah *smooth* homopolimer pektin termetilasi; (B). Wilayah *non-gelling rambuty* pektin (Cahplin, 2004).

Albersheim dkk. (2008) menyatakan bahwa terdapat beberapa bentuk senyawa pektin, antara lain:

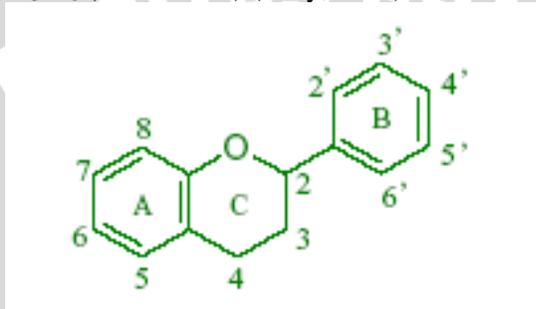
1. Protopektin merupakan induk senyawa pektin yang memiliki sifat tidak larut dalam air. Protopektin dalam keadaan terhidrolisa secara terbatas akan menghasilkan pektin atau asam pektinat.
2. Asam pektinat adalah asam poligalakturonat yang bersifat kolodial, mengandung gugus metil dalam jumlah yang tidak dapat diabaikan, pada kondisi yang cocok akan dapat membentuk gel di dalam air dengan gula dan asam, atau jika kandungan metoksilnya rendah dapat membentuk gel dengan ion-ion tertentu.
3. Pektin adalah asam pektinat yang bersifat larut dalam air dengan kandungan metil ester dengan derajat netralisasi

yang bervariasi dari mampu membentuk gel dengan gula dan asam pada kondisi yang cocok.

4. Asam pektat adalah senyawa pektin yang sebagian besar tersusun dari asam poligalakturonat yang bersifat koloidal dan tidak mengandung gugus metil ester.

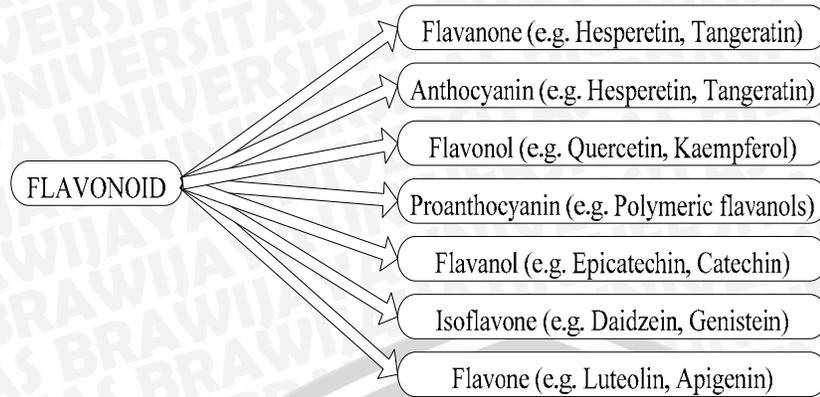
## 2.5 Struktur dan Biosintesis Flavonoid dan Kuersetin

Flavonoid merupakan metabolit sekunder yang kebanyakan ditemukan pada tanaman terestrial. Flavonoid termasuk dalam kelompok substansi alami fenol dengan beberapa struktur kimia dan pada tanaman biasanya ditemukan pada buah-buahan, sayur-sayuran, biji-bijian, akar, batang, bunga seperti pada tanaman teh dan anggur (Jedinak dkk., 2004). Flavonoid mempunyai kerangka dasar karbon yang terdiri dari 15 atom karbon, dimana dua cincin benzen ( $C_6$ ) terikat pada suatu rantai propana ( $C_3$ ) sehingga membentuk suatu susunan  $C_6-C_3-C_6$  (Gambar 2.3) (Leny, 2006).



Gambar 2.3. Struktur dasar flavonoid (Jedinak dkk., 2004).

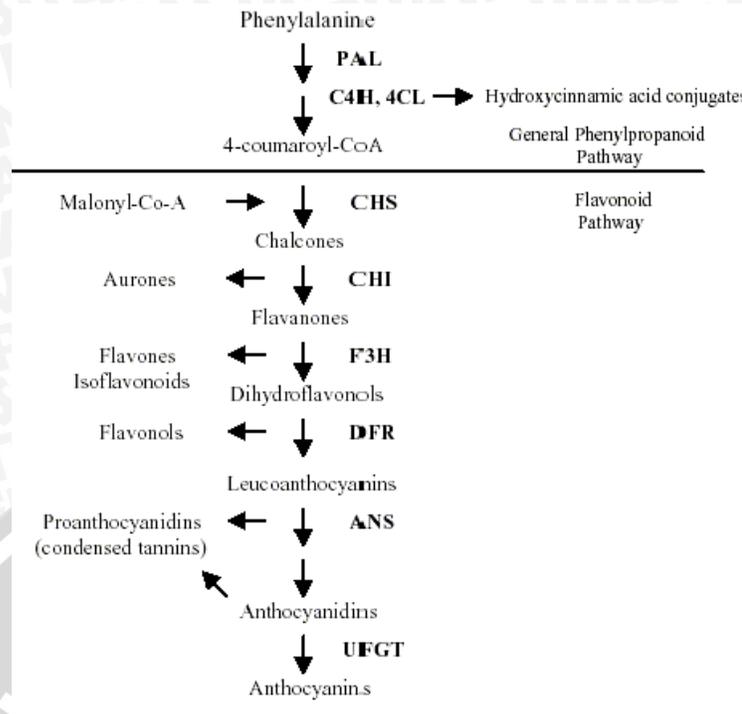
Sub kelompok flavonoid diantaranya adalah flavonol yang terdiri atas kuersetin dan kaempferol (Gambar 2.4). Kuersetin (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone) banyak memiliki fungsi penting terutama di bidang kesehatan karena termasuk antioksidan yang kuat dan berguna untuk penyembuhan penyakit kanker (Lakhanpal dan Rai, 2007). Kuersetin berfungsi sebagai senyawa antikanker dengan cara menghambat kerja enzim isomerase DNA sel kanker yang berperan dalam proses perbanyakan dan peningkatan keganasan kanker (Olthof dkk., 2000).



Gambar 2.4. Pembagian kelas flavonoid (Lakhanpal dan Rai, 2007).

Metabolit sekunder seperti flavonoid khususnya kuersetin pada umumnya disintesis melalui beberapa jalur, seperti jalur acetyl-coA, shikimat dan mevalonat. Beberapa jalur tersebut dibentuk dari hasil glikolisis. Karbohidrat akan mengalami glikolisis menjadi phosphoenolpiruvat (PEP) yang akan berubah menjadi asam shikimik melalui jalur shikimat. Jalur shikimat diawali dengan kombinasi glikolisis PEP dan jalur pentose phosphat yang akan menghasilkan erythrose-4-phosphat dan diubah menjadi asam 3-dehidroquinik yang akhirnya akan berubah menjadi asam shikimik. Asam shikimik akan menghasilkan beberapa metabolit.

Flavonoid disintesis melalui jalur phenilpropanoid. Phenilalanine amonia-lyase (PAL) mengkatalis konversi phenilalanin menjadi cinnamate. Kemudian cinnamate 4-hydroxilase (C4H) mengkatalis sintesis *p*-hydroxycinnamate dari cinnamate dan 4-coumarate, CoA ligase (4CL) mengkonversi *p*-coumarate menjadi coenzyme-A ester, aktivasi tersebut untuk beraksi dengan malonyl CoA. Selanjutnya dimulailah jalur biosintesis flavonoid yakni diawali dengan kondensasi 3 molekul malonyl-CoA dan 1 molekul 4-coumaryl-CoA (Gambar 2.5) membentuk naringenin chalcone yang dikatalis oleh enzim chalcone sintase (CHS). Chalcone dikonversi menjadi flavanone oleh enzim chalcone isomerase (CHI). Flavanone disini merupakan prekursor dari seluruh kelas flavonoid (Jedinak dkk., 2004).

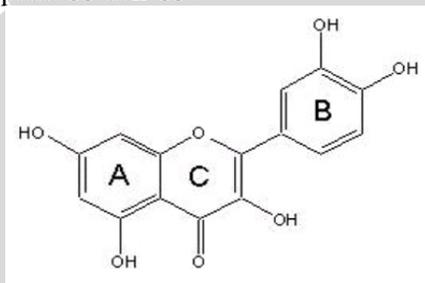


Gambar 2.5. Biosintesis flavonoid (Jedinak dkk., 2004).

Kuersetin merupakan salah satu komponen di dalam kelompok antioksidan dari metabolit sekunder flavonoid. Menurut Chalimah (2004), flavonoid merupakan suatu kelompok antioksidan yang secara alamiah ada pada sayur-sayuran, buah-buahan, dan minuman seperti teh dan anggur. Pada tanaman, flavonoid memberikan perlindungan terhadap adanya stress lingkungan, sinar ultra violet, serangga, jamur, virus, dan bakteri, di samping sebagai pengendali hormon dan enzim inhibitor. Subkelas dari polyphenols meliputi flavones, flavonols, flavanones, catechins, antocyanidin, dan isoflavones. Turunan flavonols, kuersetin dan turunan catechins, epi-catechin (EC), epigallo-catechin (EGC), epigallo-catechin gallate (EGCg) umumnya ditemukan di dalam teh. Kuersetin dikenal sebagai antioksidan kuat maupun antioksidan potensial dengan kekuatan 100 kali lebih tinggi daripada vitamin C dan 25 kali dari vitamin E.

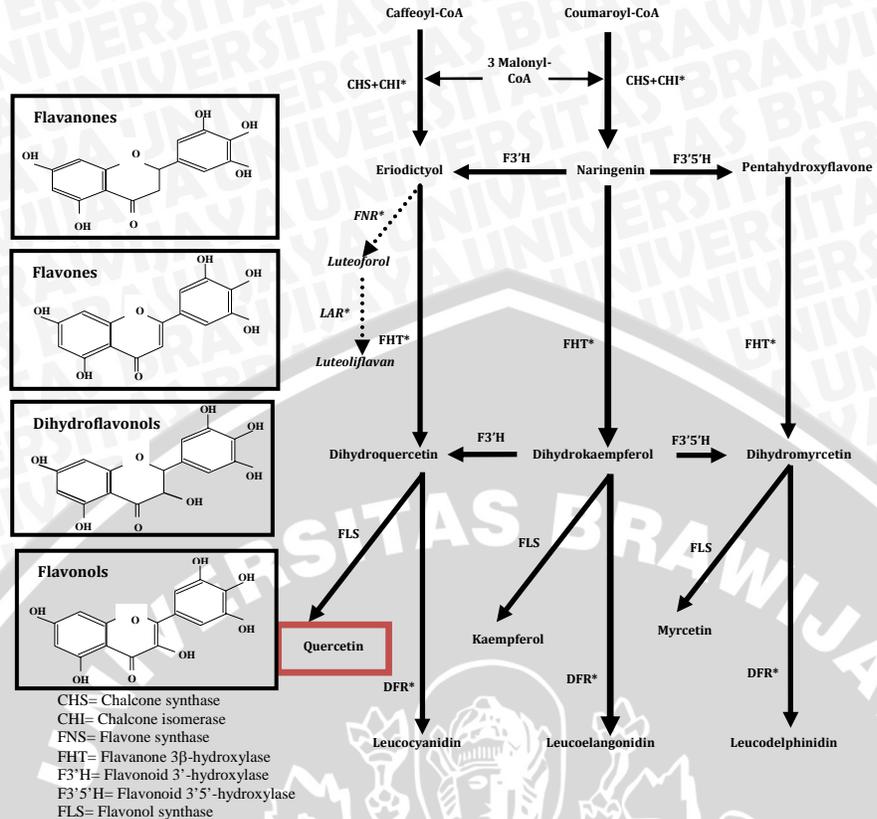
Kuersetin merupakan senyawa flavonoid dari kelompok flavonol dan terdapat terutama pada tanaman teh, tomat, apel, kakao, anggur, dan bawang. Kuersetin-3-glukosida (isokuersetin), kuersetin-3-rhamnoside (kuerstrin), dan kuersetin-3-rutinoside (rutin) adalah glikosida kuersetin. Flavonol kuersetin, mirisetin, robinitin, dan gossipetin memiliki sifat antioksidan yang amat potensial. Flavonol utama pada daun teh adalah kuersetin, kaempferol, dan mirisetin. Sekitar 2-3 persen bagian teh yang larut dalam air merupakan senyawa flavonol, yang merupakan bentuk glikosida (Kracoff, 2001).

Menurut Lamson dan Brignall (2000) Kuersetin memiliki aktivitas antioksidan yang kuat karena memiliki tiga ciri pada strukturnya, yaitu 3',4'-dihidroksi pada cincin B; 2,3-ikatan rangkap pada cincin C dan sebuah gugus 3-hidroksil pada cincin C dan sebuah gugus 5-hidroksil pada cincin A (Gambar 2.6). Dilihat dari struktur kimianya, kuersetin memiliki aktivitas kuat sebagai pemberi hidrogen karena kandungan hidroksilasi yang cukup, yakni 5 gugus OH dan lokasi gugus hidroksilnya terdapat pada sisi aktif (C5, C7, C3, C3' dan C4'). Selain itu, kuersetin juga memiliki struktur yang mampu sebagai pengkelat logam, yakni gugus karbonil pada C4 dan gugus hidroksil pada C3 dan C5.



Gambar 2.6. Struktur kimia kuersetin (Jedinak dkk., 2004).

Biosintesis kuersetin yang termasuk dalam kelompok flavonol diawali dengan katalisasi oleh enzim CHS pada kondensasi 3 molekul malonyl-CoA dan 1 molekul 4-coumaroyl-CoA menjadi naringenin chalcone, yang merupakan substrat dari CHI dan akan dikonversi menjadi naringenin. Aktivitas enzim CHI/CHS lebih tinggi sebagai substrat dari 4-coumaroyl-CoA daripada caffeoyl-CoA karena digunakan untuk pembentukan yang berikutnya yakni flavanone, substrat ini spesifik untuk enzim CHS (Gambar 2.7).



Gambar 2.7. Biosintesis Kuersetin (Punyasiri dkk., 2004)

Tiga kelompok flavanone yaitu eryidictyiol, naringenin, dan pentahydroxyflavanone semuanya diterima sebagai substrat oleh FHT, tetapi aktivitas yang tertinggi adalah naringenin. Selanjutnya disepakati bahwa spesifisitas substrat CHS mengindikasikan bahwa F3'H dan F3'5'H yang akan mengaktalis dihidrokampferol berubah menjadi dihidrokuersetin kemudian dengan bantuan enzim FLS kuersetin akan terbentuk (Punyasiri dkk., 2004).

## BAB III METODE PENELITIAN

### 3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan mulai bulan Oktober 2007 hingga Desember 2008 di Laboratorium Fisiologi, Kultur, dan Mikroteknik Jurusan Biologi, dan Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang. Sampel daun teh adalah varietas assamica dan berasal dari Kebun Teh Wonosari Lawang-Malang.

### 3.2 Rancangan Penelitian

Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial yang terdiri dari 2 faktor. Faktor yang pertama yaitu 4 macam konsentrasi elisitor pektin sebesar 0 ppm (sebagai kontrol), 50 ppm, 75 ppm, dan 100 ppm. Sedangkan faktor kedua adalah lama kultur selama 4 dan 8 minggu. Pengukuran berat basah kalus dilakukan selama 8 minggu pada minggu ke 0, 2, 4, 6, dan 8 untuk mengetahui kurva pertumbuhan kalus. Berat basah dan berat kering kalus diukur pada minggu ke-4 dan minggu ke-8 untuk selanjutnya dianalisis kandungan flavonoid dan kuersetin kalus.

### 3.3 Tahapan Penelitian

#### 3.3.1 Pembuatan Media

Media yang digunakan terdiri atas media dasar Murashige Skoog (MS) + zat pengatur tumbuh kinetin dan 2,4-D untuk induksi kalus dan media MS + zat pengatur tumbuh kinetin dan 2,4-D serta elisitor pektin untuk elisitasi kalus. Pembuatan media MS untuk induksi kalus dibuat dengan mencampurkan larutan stok (Lampiran 1) ke dalam erlenmeyer. Selanjutnya ditambahkan gula 30 gram, kemudian dilarutkan dengan penambahan akuades hingga mendekati volume 1000 ml. Kemudian pH larutan diatur hingga mencapai 5,8 lalu ditambahkan agar 11 gram dan akuades ditambahkan hingga volume larutan tepat mencapai 1000 ml dan dipanaskan hingga mendidih. Setelah mendidih, larutan dituang ke dalam botol kultur masing-masing botol sekitar 10 ml, lalu ditutup menggunakan aluminium foil dan diberi label. Sterilisasi dilakukan dengan autoklaf pada suhu

121°C selama 9 menit. Selanjutnya media dibiarkan hingga memadat dan siap untuk digunakan. Sedangkan cara pembuatan media elisitasi adalah sama dengan pembuatan media MS untuk induksi kalus hanya saja setelah pencampuran larutan stok dilakukan penambahan elisitor pektin dengan konsentrasi 0, 50, 75, 100 mg/l media MS.

### 3.3.2 Induksi dan Pemeliharaan Kalus

Kalus diinduksi dari eksplan daun teh muda (daun ke dua dari pucuk) yang berukuran sekitar 3x2 cm, diawali dengan pencucian daun menggunakan air mengalir selama  $\pm 30$  menit dan direndam dengan larutan fungisida 0,5 % selama 30 menit sambil sesekali digoyang. Setelah itu di dalam LAF dilakukan pencucian daun teh dengan NaOCl 1,05 % pada erlenmeyer selama 20 menit sambil digoyang perlahan kemudian dibilas dengan akuades steril selama 5 menit sebanyak 3 kali. Daun teh yang telah steril dipotong dengan dihilangkan bagian tepi daun dan tulang daunnya menggunakan skalpel di atas cawan petri lalu potongan daun berukuran sekitar 1 x 1 cm ditanam pada media induksi kalus dengan bagian adaksial berada pada bagian bawah atau menempel pada media, masing-masing botol diisi 4 – 5 potongan daun. Daun teh yang telah ditanam dalam medium induksi diinkubasi dibawah sinar lampu dengan intensitas cahaya sebesar 35,39 watt/m<sup>2</sup> terus menerus, pada suhu 25°C selama 1 bulan untuk selanjutnya dilakukan subkultur pada media MS yang baru, subkultur atau pemeliharaan kalus dilakukan sampai 2 atau 3 kali dan kalus siap dielisitasi.

### 3.3.3 Elisitasi

Elisitasi dilakukan dengan menanam kalus umur 1 bulan setelah subkultur dengan berat  $\pm 0,04$  gram pada media elisitasi. Pada setiap botol media ditanam 4 *clump* kalus. Kalus dikultur di bawah sinar lampu dengan intensitas cahaya sebesar 35,39 watt/m<sup>2</sup> terus menerus, pada suhu 25°C selama 4 dan 8 minggu. Kalus yang telah ditanam pada medium elisitasi diamati morfologinya setiap 1 minggu sekali dan ditimbang berat basahnya setiap 2 minggu sekali untuk mengetahui kurva pertumbuhan kalus selama 8 minggu. Pada minggu ke-4 dan minggu ke-8 setelah kultur, kalus ditimbang berat basahnya dan dikeringkan dalam oven hingga mencapai berat

konstan (pada suhu 70°C selama 2 hari) sehingga didapat berat kering kalus yang siap untuk dilakukan analisis kandungan flavonoid dan kuersetin kalus.

### 3.3.4 Analisis Kandungan Flavonoid dan Kuersetin

Ekstraksi kandungan metabolit sekunder kalus teh khususnya flavonoid dilakukan berdasarkan metode Yuliana dkk. (2003) yang telah dimodifikasi yaitu dengan cara kalus teh yang telah kering dan dihaluskan, ditimbang sebanyak 0,25 g, lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Ke dalam tabung tersebut ditambahkan 5 ml aseton dan 0,5 ml larutan HCl 25%, kemudian diekstraksi di atas penangas air pada suhu 70°C selama 3 menit. Selanjutnya didinginkan dan ekstrak tersebut disaring ke dalam labu ukur 25 ml dengan kertas saring halus, pencucian ampas dengan acetone diulang hingga diperoleh 25 ml filtrat.

Filtrat diambil 5 ml, selanjutnya ditambah 3,75 ml etil asetat, kemudian digojog dengan shaker dan didiamkan selama 15 menit hingga terbentuk 2 lapisan. Lapisan bawah yang merupakan fase aseton-air dipisahkan dari fase atas (etil asetat). Fase aseton-air diekstrak 2 kali dengan 10 ml etil asetat. Fase etil asetat dikumpulkan dan diekstrak dengan 10 ml akuades menggunakan shaker dengan kecepatan 180 rpm selama 5 menit, dilakukan pengulangan ekstraksi dengan akuades sebanyak 3 kali. Fase etil asetat yang didapat ditampung dalam tabung polipropilen dan ditambahkan etil asetat hingga mencapai volume 12,5 ml.

Analisis kandungan flavonoid dilakukan dengan mengambil larutan bagian atas hasil ekstraksi sebanyak 2,5 ml ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 0,125 ml larutan Na-sitrat 0,5% dalam air dan 0,5 ml campuran larutan (2 g  $AlCl_3 \cdot 6H_2O$  ditambah dengan 100 ml larutan asam asetat 5% dalam metanol). Selanjutnya ke dalam tabung reaksi tersebut ditambahkan larutan asam asetat 5% dalam metanol sampai mencapai volume 6,25 ml dan dibiarkan selama 25 menit. Larutan diukur absorbansinya pada 425 nm dengan menggunakan larutan blanko (0,5 ml larutan Na sitrat 0,5% dalam air ditambah dengan larutan asam asetat 5% dalam metanol sampai tanda batas pada labu ukur 25 ml). Kandungan flavonoid dihitung dengan rumus :

$$\% \text{ flavonoid} = A \times 0,735/G$$

Keterangan :

- A = absorbansi sampel  
 G = berat kering sampel dalam g  
 =  $(100 - KA)\% \times W$   
 K.A = susut pengeringan ( $W_{70^\circ} - W_{110^\circ}/W_{70^\circ}$ )  
 W = berat sampel sesuai dengan penimbangan dalam g  
 $W_{70^\circ}$  = Kalus dioven pada suhu  $70^\circ\text{C}$  selama 2 hari  
 $W_{110^\circ}$  = Kalus kering dioven pada suhu  $110^\circ\text{C}$  selama 24 jam

Hasil perhitungan kandungan flavonoid dikonversikan dalam bentuk  $\mu\text{g}/\text{mg}$  untuk memudahkan perbandingan dengan kandungan kuersetin kalus teh.

Analisis kualitatif dilakukan dengan menggunakan metode KLT (Kromatografi Lapis Tipis) untuk mengetahui keberadaan kuersetin dalam kalus teh. Fase etil asetat yang sudah didapat  $\pm 10$  ml dipiekatkan dengan gas nitrogen kemudian diencerkan dengan 0,25 ml metanol. Pada analisis ini digunakan larutan standar kuersetin. Analisis dengan KLT dilakukan dengan cara menotolkan 20  $\mu\text{l}$  ekstrak pekat kalus perlakuan pada plat *silica gel* 60  $F_{254}$  dengan menggunakan pipa kapiler pada jarak 1 cm dari tepi plat *silica gel* 60  $F_{254}$ . Pada jarak 1 cm tersebut, dibuat titik sebanyak sampel yakni berjajar 20 sampel yang terdiri dari standar dengan 4 macam konsentrasi kemudian diikuti masing-masing konsentrasi elisitor pada lama elisitasi 4 dan 8 minggu sebanyak 2 ulangan, serta ditambahkan ekstrak dari daun teh kering sebagai pembanding. Setiap pergantian larutan, pipa kapiler dicuci dengan metanol. Plat yang sudah ada totolan sampel, dimasukkan dalam eluen dengan perbandingan 10:10:2 (toluen : dietil eter : asam asetat) sampai tanda batas kertas (1 cm dari batas kertas bagian atas).

Hasil elusi dideteksi dengan sinar UV pada panjang gelombang 254 nm dan difoto dengan kamera digital. Kemudian hasil foto plat di masukkan dalam program TLSee untuk diketahui nilai  $R_f$  dan luas area hasil totolan tersebut. Setelah didapatkan luas area standar dan masing-masing sampel (Lampiran 4 Gambar 3-10) dilakukan perhitungan kandungan kuersetin berdasarkan rumus umum perhitungan kandungan metabolit sekunder, yaitu:

$$KQ = \frac{\frac{V_{\text{ext}}}{V_{\text{tot}}} \times K_w(\text{ng})}{\text{Berat Sampel (mg)}} \times \frac{100\%}{100 - KA}$$

Keterangan :

Vext = Volume ekstrak

Vtot = Volume totalan

Kw = Konsentrasi kuersetin hasil perhitungan dari standar  
=  $\frac{\text{luas area sampel} + 0,145}{0,0002}$

KA =  $\frac{W70^\circ - W110^\circ}{W70^\circ} \times 100 \%$

W70° = Kalus dioven pada suhu 70°C selama 2 hari

W110° = Kalus kering dioven pada suhu 110°C selama 24 jam

### 3.3.5 Analisis Data

Data kuantitatif yang diperoleh diolah dan diuji menggunakan uji ANOVA (*Analysis of Variance*) menggunakan program statistik *SPSS Release For Windows 15*. Apabila terdapat beda maka akan dilanjutkan dengan uji Duncan pada tingkat kepercayaan 95% untuk mengetahui apakah terdapat beda nyata dari perlakuan yang diberikan.

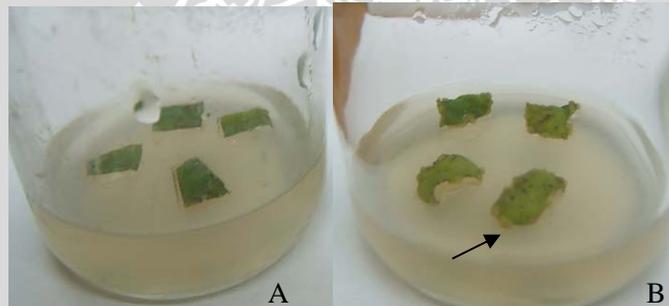


## BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Pengaruh Pektin terhadap Pertumbuhan Kalus Teh

Eksplan daun teh yang dikultur pada medium induksi kalus mulai memperlihatkan respon pertumbuhan pada minggu kedua, yang ditandai dengan ukuran eksplan yang semakin membesar dan berlekuk-lekuk. Kalus mulai muncul di bagian tepi eksplan daun setelah empat sampai enam minggu dikultur pada medium induksi kalus dan selanjutnya akan menutupi permukaan eksplan (Gambar 4.1). Munculnya kalus pada tepian eksplan merupakan respon pertahanan bagi tanaman untuk menutupi jaringan yang terluka. Evans dkk. (2003) menyebutkan bahwa ketika tanaman dilukai maka kalus akan terbentuk akibat selnya mengalami kerusakan dan terjadi otolisis, dan dari sel yang rusak tersebut dihasilkan senyawa-senyawa yang merangsang pembelahan sel di lapisan berikutnya sehingga terbentuk gumpalan sel-sel yang terdediferensiasi.

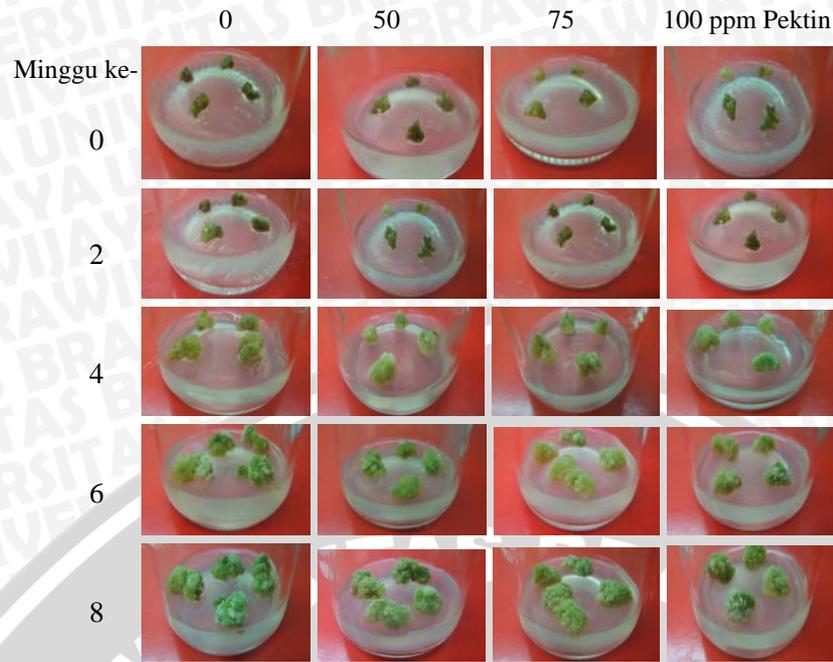
Berdasarkan studi pendahuluan eksplan daun teh menghasilkan pertumbuhan kalus yang lebih cepat dan lebih baik pada medium MS + 1 ppm 2,4-D + 1 ppm kinetin dibandingkan dengan medium MS + 1 ppm BAP + 0,5 ppm 2,4-D. Oleh karena itu untuk tahapan penelitian selanjutnya digunakan medium MS + 1 ppm 2,4-D + 1 ppm kinetin. Agar mendapatkan materi kalus yang cukup untuk perlakuan elisitasi maka kalus yang didapat di subkultur setiap umur 4 minggu sebanyak 3 kali.



Gambar 4.1 Pertumbuhan eksplan daun teh pada media induksi kalus. (A). Eksplan daun yang baru dikultur; (B). Kalus yang mulai tampak pada tepi eksplan setelah 4 minggu.

Rasio hormon auksin dan sitokinin seimbang yang digunakan dalam penelitian ini mampu menghasilkan kalus dari eksplan daun teh yang lebih cepat daripada penggunaan hormon yang berbeda konsentrasinya. Salah satu jenis auksin yaitu 2,4-D dapat memacu pembelahan sel. Pembelahan sel terus menerus dengan diikuti pembesaran dan pemanjangan sel akan menyebabkan terbentuknya kalus, terutama apabila auksin berinteraksi dengan hormon sitokinin yang pada penelitian ini digunakan kinetin. Litz dkk. (1995) menyatakan bahwa penggunaan kombinasi antara auksin (2,4-D) dengan sitokinin (Benzyl Adenin ataupun kinetin) yang seimbang akan meningkatkan proses induksi kalus. Auksin jenis 2,4-D merupakan auksin kuat yang sering digunakan secara tunggal untuk menginduksi terbentuknya kalus dari berbagai jaringan tanaman, selain itu sitokinin (Kinetin atau Benzyl Adenin) umum digunakan dalam proses regenerasi kultur *in vitro* karena zat pengatur tumbuh ini berfungsi dalam pembelahan sel dan diferensiasi tunas adventif dari kalus (Syahid dan Kristina, 2007). Sumaryono dan Riyadi (2005) menyatakan bahwa 2,4-D pada konsentrasi 1 $\mu$ M yang dikombinasikan dengan beberapa variasi konsentrasi hormon kinetin pada medium MS mampu menginduksi pembentukan kalus dengan cepat pada kultur pucuk tanaman kina (*Cinchona ledgeriana*).

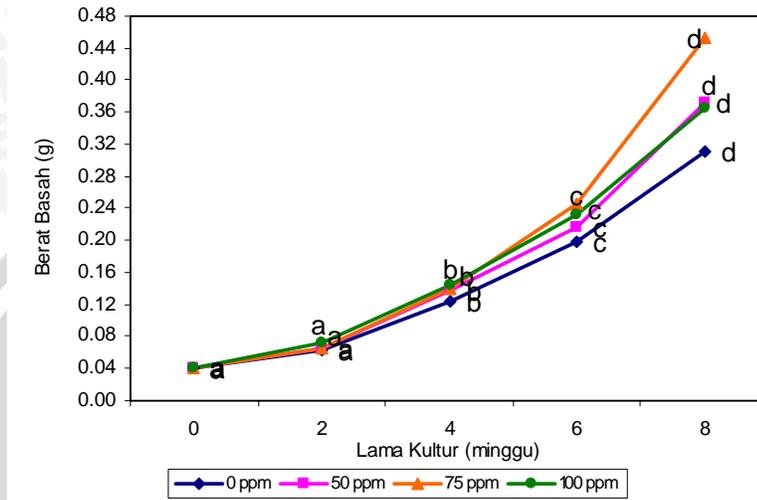
Seluruh kalus yang dikultur pada medium dengan atau tanpa penambahan pektin menunjukkan pertumbuhan kalus yang terus meningkat selama 8 minggu. Berdasarkan hasil pengamatan secara visual, kalus yang terbentuk mempunyai tekstur padat dan berwarna hijau muda hingga hijau kekuningan. Selain itu diketahui bahwa perbedaan ukuran kalus mulai tampak pada minggu ke empat pada seluruh medium elisitasi (Gambar 4.2). Seluruh kalus yang terbentuk pada masing-masing konsentrasi medium elisitasi mempunyai ukuran yang hampir seragam hingga akhir pengamatan (8 minggu). Kalus dapat terdiri dari sekumpulan sel yang longgar dan friabel, dan ada pula yang terdiri dari sekumpulan sel yang padat (kompak) dan bertekstur keras. Kalus kompak yang terbentuk pada penelitian ini berasal dari eksplan daun teh yang ditumbuhkan pada medium induksi kalus yang mengandung rasio hormon auksin dan sitokinin seimbang dan konsentrasinya yang tidak terlalu tinggi, dan berwarna kuning kehijauan karena eksplan yang digunakan adalah daun muda yang berwarna hijau.



Gambar 4.2 Pengaruh beberapa macam konsentrasi pektin terhadap pertumbuhan kalus teh selama 8 minggu.

Menurut Evans dkk. (2003), tekstur kalus tergantung pada jaringan, umur kalus, dan kondisi pertumbuhan. Morfologi dan warna kalus biasanya tergantung dari jenis sumber eksplannya, dimana ada yang bersifat remah atau friable ada juga yang bersifat kompak atau padat, sedangkan warna kalus biasanya mengikuti warna jenis sumber eksplan juga. Banyak hal yang mempengaruhi morfologi dan pertumbuhan kalus, diantaranya adalah sumber eksplan, komposisi medium kultur seperti zat pengatur tumbuh, kondisi pertumbuhan seperti suhu dan cahaya, serta lamanya waktu pertumbuhan kalus (Hanafy dan Lobna, 2007). Penggunaan zat pengatur tumbuh auksin dengan konsentrasi yang tinggi sebesar 10 ml/L media MS menyebabkan kalus keladi tikus bersifat remah dan mudah lepas selama 8 minggu waktu inisiasi (Syahid dan Kristina, 2007).

Hasil analisis uji ragam (Lampiran 5 di Tabel 1) menunjukkan bahwa pertumbuhan kalus teh dipengaruhi oleh lama kultur, tetapi tidak dipengaruhi oleh konsentrasi elisitor pektin yang ditambahkan dalam medium. Berat basah kalus pada semua perlakuan mulai meningkat secara nyata pada minggu ke empat. Peningkatan pertumbuhan kalus ini terus terjadi hingga pada lama kultur 8 minggu. Walaupun secara statistik tidak berbeda nyata, namun ada kecenderungan pertumbuhan kalus pada media yang ditambah pektin lebih tinggi dibandingkan dengan media kontrol tanpa penambahan pektin (Gambar 4.3).



Gambar 4.3 Kurva pertumbuhan kalus teh selama 8 minggu pada medium dengan penambahan beberapa konsentrasi elisitor pektin. Keterangan: huruf kecil yang sama pada konsentrasi elisitor pektin yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan uji Duncan pada tingkat signifikansi 0,05.

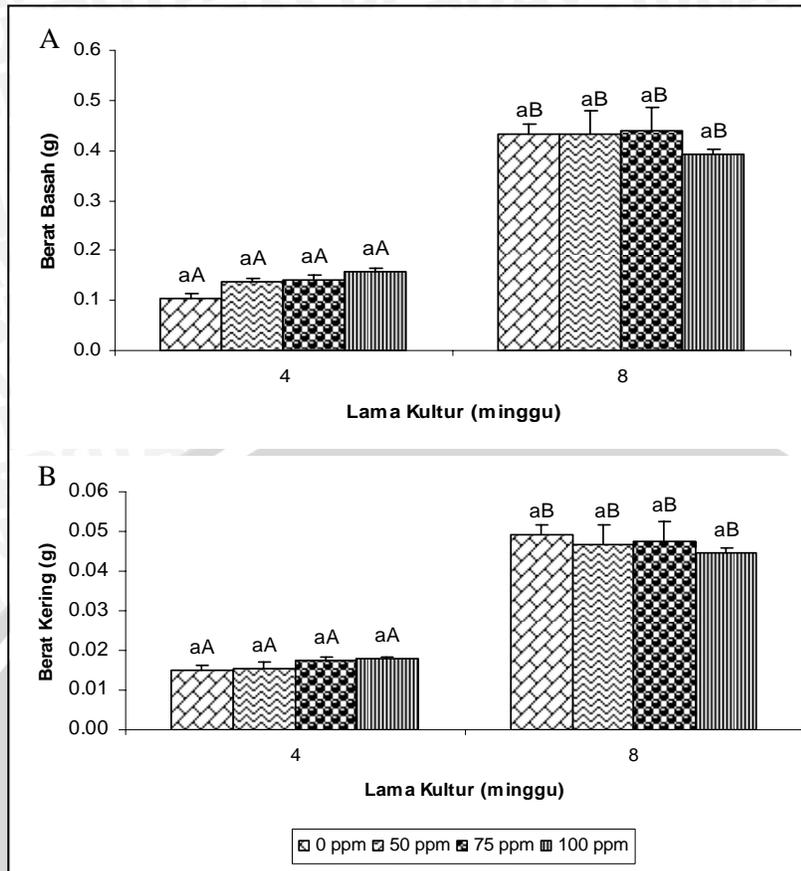
Pertambahan berat basah kalus umur 4 minggu sekitar 3-4 kali dari berat awal, sedangkan pada 8 minggu kultur meningkat antara 8-10 kali. Pertumbuhan kalus pada akhir pengamatan (minggu ke 8) masih terus meningkat dan kalus juga masih tampak berwarna hijau segar. Hal ini menunjukkan bahwa pertumbuhan kalus masih dalam fase eksponensial dan belum memasuki fase stasioner. Berdasarkan

hal tersebut, diketahui bahwa kalus masih aktif membelah dan terus melakukan pertumbuhan karena nutrisi dalam medium tumbuhnya masih terpenuhi.

Kurva pertumbuhan kalus hampir sama dengan kurva tumbuh bakteri yang terdiri dari 4 fase, yaitu fase lag, fase eksponensial, fase linear, dan fase stasioner. Fase lag dimana belum ditemukan adanya tanda-tanda pembelahan sel, fase eksponensial yang dicirikan dengan terjadinya peningkatan jumlah sel, fase linear yakni saat kecepatan pertumbuhan selnya akan mencapai maksimal, sedangkan fase stasioner adalah fase pada saat tidak terjadi pembelahan lagi atau terdapat beberapa jumlah sel yang mengalami kematian (Ruyack dkk., 2007).

Berat basah dan berat kering kalus pada lama kultur 4 minggu memiliki kecenderungan mengalami peningkatan seiring dengan semakin tingginya konsentrasi elisitor yang diberikan walaupun tidak signifikan berdasarkan analisis uji ragam pada Lampiran 5 di Tabel 2 dan 3. Berat basah kalus pada medium kontrol adalah 0,104 g dan pada perlakuan pektin 50, 75, dan 100 ppm mempunyai berat basah berturut-turut 0,137 g, 0,142, dan 0,157 g. Sedangkan berat kering kalus teh pada kontrol medium kontrol adalah 0,015 g dan pada perlakuan pektin 50 ppm adalah 0,016 g, sedangkan pada perlakuan pektin 75 dan 100 ppm adalah sama sebesar 0,018 g (Gambar 4.4).

Pada lama kultur 8 minggu, rata-rata berat basah kalus juga mengalami kecenderungan peningkatan dari kontrol (0,431 g) pada medium elisitasi 50 ppm (0,433 g) dan 75 ppm (0,440 g), tetapi terjadi penurunan berat basah pada medium elisitasi 100 ppm (0,393 g). Sedangkan untuk rata-rata berat kering pada medium yang mengandung elisitor pektin mengalami penurunan dari kontrol meskipun tidak signifikan. Hasil uji ragam dan uji lanjut terhadap berat basah dan berat kering kalus menunjukkan bahwa rata-rata berat basah dan berat kering kalus pada seluruh media perlakuan pada lama kultur 4 minggu nyata lebih rendah daripada rata-rata berat basah dan berat kering kalus pada lama kultur 8 minggu (Gambar 4.4). Hal tersebut dikarenakan berat basah dan berat kering kalus lebih dipengaruhi oleh umur kalus yang dikultur karena rata-rata nilai berat basah dan berat kering yang lebih tinggi pada umur 8 minggu juga terjadi pada kalus yang berada pada medium tanpa penambahan pektin (kalus kontrol).



Gambar 4.4 Pengaruh pektin terhadap berat basah dan berat kering kalus selama 4 dan 8 minggu. Keterangan : huruf kecil yang sama pada lama kultur yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata; huruf kapital yang sama pada konsentrasi elisitor pektin yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan uji Duncan ( $\alpha$  0,05). Garis bar menunjukkan nilai Standar Error (n=10).

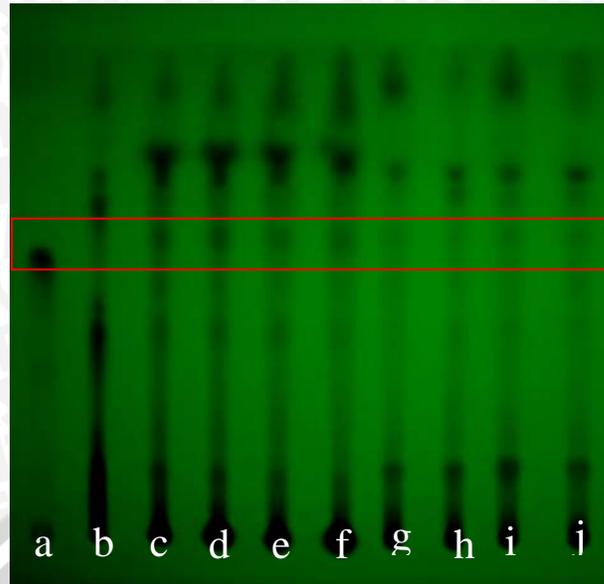
Rata-rata nilai berat basah dan berat kering kalus yang lebih tinggi pada medium yang mengandung elisitor pektin daripada medium kontrol meskipun tidak signifikan mengindikasikan bahwa elisitor pektin mampu meningkatkan biomassa kalus. Pektin

merupakan elisitor biotik dari golongan polisakarida yang bisa didapat dari sel tanaman maupun kultur sel jamur yang dapat mengubah permeabilitas membran plasma sel yang dielisitasi. Berdasarkan penelitian Sudha dan Ravishankar (2003), diketahui bahwa elisitor yang berasal dari kultur jamur *Aspergillus niger* mampu menginduksi perubahan permeabilitas membran plasma dari kalus *Daucus carota* sehingga mampu meningkatkan biomassa kalus tersebut daripada kontrolnya.

#### 4.2 Pengaruh Pektin terhadap Kandungan Flavonoid dan Kuersetin pada Kalus Teh

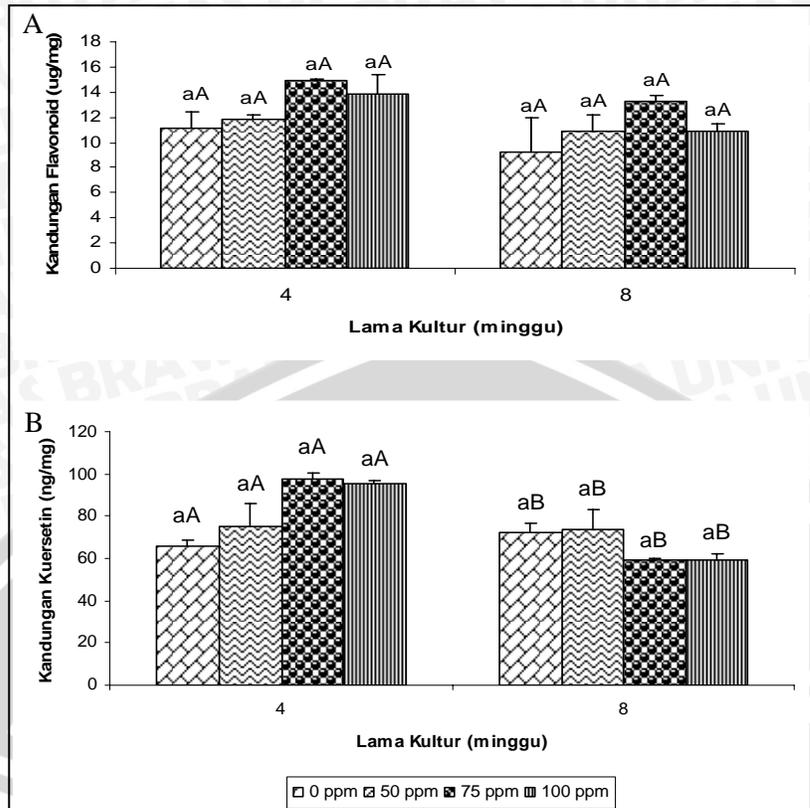
Hasil ekstraksi didapatkan ekstrak berwarna kuning kecoklatan yang mengindikasikan adanya senyawa flavonoid dalam ekstrak tersebut. Murthihapsari (2008) menyatakan bahwa, senyawa flavonoid dari hasil ekstraksi umumnya berwarna kuning hingga kuning kecoklatan. Dalam ekstrak flavonoid mengandung kuersetin yang merupakan salah satu bagian dari flavonoid yang termasuk dalam kelompok flavonol. Maka untuk mengetahui kadar kuersetin dari hasil ekstraksi dilakukan metode KLT. Senyawa kuersetin hasil KLT dari ekstrak kalus teh pada masing-masing konsentrasi elisitor pektin pada lama kultur 4 dan 8 minggu tampak sejajar dengan senyawa standar kuersetin yang ditotolkan pada plat dengan konsentrasi 4000 ng. Seluruh noda yang sejajar dengan senyawa kuersetin standar tersebut tampak lebih tipis dibandingkan standarnya yang berarti konsentrasi senyawa kuersetin pada sampel adalah di bawah 4000 ng (Gambar 4.5).

Hasil KLT pada plat silika gel tersebut difoto dengan kamera digital dan dimasukkan dalam program TlSee untuk diketahui masing-masing nilai Rf dan luas areanya sehingga dapat dihitung kandungan kuersetinnya. Nilai Rf dari standar kuersetin dan masing-masing sampel yang terbaca dalam program berkisar antara 0.53 – 0.58, dengan nilai Rf tersebut juga dapat diketahui luas area masing-masing standar dan juga sampel yang selanjutnya digunakan untuk perhitungan nilai kandungan kuersetin kalus teh. Besarnya nilai Rf setiap substansi spesifik tergantung dari sifat-sifat fisik masing-masing substansi terhadap fasa gerak, sehingga dalam larutan eluen yang sama dan dalam kondisi pengelusan yang sama, harga Rf suatu substansi adalah sama (Shriner, 1980).



Gambar 4.5 Hasil KLT senyawa kuersetin ekstrak kalus teh hasil elisitasi dengan beberapa konsentrasi pektin selama 4 dan 8 minggu. Standar kuersetin 4000 ng (a); Daun (b); Pektin konsentrasi 0, 50, 75, 100 ppm pada umur 4 minggu (c, d, e, f); Pektin konsentrasi 0, 50, 75, 100 ppm pada umur 8 minggu (g, h, i, j).

Kandungan flavonoid kalus teh lebih rendah dibandingkan dengan kandungan flavonoid daun. Kandungan flavonoid daun teh sebesar 28,44  $\mu\text{g}/\text{mg}$  sedangkan pada kalus sebesar 10,16  $\mu\text{g}/\text{mg}$ . Hasil uji analisis ragam (Lampiran 5 di tabel 4) menunjukkan bahwa konsentrasi elisitor dan lama kultur tidak berpengaruh terhadap kandungan flavonoid. Namun demikian kandungan flavonoid pada kalus yang dikultur pada media dengan penambahan pektin selama 4 minggu relatif lebih tinggi dibandingkan dengan kandungan flavonoid pada lama kultur 8 minggu (Gambar 4.6). Rata-rata kandungan flavonoid pada lama kultur 4 minggu berkisar antara 11,10 hingga 14,95  $\mu\text{g}/\text{mg}$ . Sedangkan pada lama kultur 8 minggu kandungan flavonoidnya berkisar antara 9,23 hingga 13,26  $\mu\text{g}/\text{mg}$ .



Gambar 4.6 Pengaruh pektin terhadap kandungan flavonoid (A) dan kuersetin (B) pada kalus teh. Keterangan : huruf kecil yang sama pada lama kultur yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata; huruf kapital yang sama pada konsentrasi elisitor pektin yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan uji Duncan ( $\alpha$  0,05). Garis bar menunjukkan nilai Standar Error (n=2).

Hasil analisis menunjukkan bahwa pada kalus teh kandungan kuersetin hanya sekitar  $6 \times 10^{-3}$  % dari kandungan flavonoid total. Kandungan flavonoid kalus sekitar  $15 \mu\text{g}/\text{mg}$  dan kandungan kuersetinnya sekitar  $98 \text{ ng}/\text{mg}$ . Kandungan kuersetin kalus ( $69,18 \text{ ng}/\text{mg}$ ) lebih rendah daripada kandungan kuersetin daun ( $106,9 \text{ ng}/\text{mg}$ ).

Hasil analisis uji ragam menunjukkan bahwa kandungan kuersetin hanya dipengaruhi oleh lama kultur, sedangkan konsentrasi elisitor pektin tidak berpengaruh (Lampiran 5 di Tabel 5). Pada lama kultur 4 minggu kalus kontrol memiliki kandungan kuersetin sebesar 65.8 ng/mg. Kalus dengan perlakuan pektin 50 ppm memiliki kandungan kuersetin sebesar 75.3 ng/mg, kandungan kuersetin tertinggi adalah pada kalus dengan 75 ppm elisitor pektin yaitu sebesar 97.9 ng/mg, sedangkan pada kalus dengan penambahan 100 ppm elisitor pektin mengalami sedikit penurunan kandungan kuersetin, tetapi nilainya masih lebih tinggi daripada kontrol yaitu sebesar 95.4 ng/mg (Gambar 4.6).

Kandungan kuersetin kalus pada lama kultur 8 minggu pada medium dengan penambahan pektin 50 ppm sebesar 74.0 ng/mg mengalami sedikit peningkatan dari kontrol (72.5 ng/mg), akan tetapi kandungan kuersetin kalus pada medium dengan perlakuan pektin 75 ppm dan 100 ppm kandungan kuersetin menurun daripada kontrol yaitu sebesar 59.0 ng/mg dan 59.6 ng/mg.

Kandungan flavonoid dan kuersetin pada kalus lebih rendah dibandingkan kandungan flavonoid dan kuersetin daun. Hal ini berarti teknik kultur jaringan meskipun tidak dapat meningkatkan kandungan metabolit sekunder tapi dapat digunakan sebagai langkah alternatif untuk menghasilkan metabolit sekunder suatu tanaman yang berguna sebagai senyawa obat. Robins (2004) menyatakan bahwa jaringan yang telah mengalami diferensiasi mampu menghasilkan enzim yang lebih kompleks untuk menghasilkan metabolit sekunder tertetu. Meskipun begitu teknik kultur jaringan memiliki beberapa kelebihan sehingga mudah untuk menghasilkan metabolit sekunder dalam suatu tanaman. Kelebihan dari teknik kultur jaringan tanaman diantaranya adalah bebas dari kontaminasi mikroba, tidak bergantung kepada kondisi lingkungan seperti keadaan geografi, iklim dan musim, dan dengan teknik ini senyawa bioaktif dapat diproduksi dalam kondisi terkontrol dan mudah untuk memperbanyak sel yang menghasilkan senyawa metabolit sekunder tertentu.

Peningkatan metabolit sekunder flavonoid dan kuersetin pada kalus teh yang mengandung elisitor pektin terjadi karena adanya mekanisme pertahanan dari kalus teh tersebut, akibat adanya ikatan elisitor dengan protein tertentu yang ada pada membran sel yang

berfungsi sebagai sinyal transduksi sehingga mampu meningkatkan kandungan metabolit sekundernya. Adanya respon pertahanan dari kalus sebagai akibat dari adanya pektin diduga dapat menyebabkan adanya peningkatan ekspresi gen yang mengkode enzim untuk menghasilkan metabolit sekunder flavonoid dan kuersetin seperti Phenylalanine ammonia lyase (PAL) maupun Flavonol Synthase (FLS).

Reseptor pada membran plasma yang menerima sinyal elisitor akan menyebabkan G-protein dan phosphatase mengaktifkan H<sup>+</sup>-ATPase. Adanya hiperpolarisasi membran menginisiasi aktivasi *calcium channel* dan peningkatan kalsium dalam sitoplasma akan menginisiasi aktivasi CDPK kinase yang meregulasi penyusunan NADPH oksidase. Radikal oksigen aktif dan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> yang dihasilkan oleh NADPH oksidase akan mengaktifkan MAP kinase yang memfosforilasi faktor transkripsi dan meningkatkan tingkat ekspresi gen pertahanan. Salah satu mekanisme pertahanannya yaitu aktivasi gen biosintesis fitoaleksin. Aktivasi gen pertahanan juga terjadi melalui kalsium dengan melewati jalur NADPH oksidase (Bulgakov dkk., 2003).

Elisitor karbohidrat seperti pektin yang merupakan polisakarida dan biasanya diekstrak dari dinding sel buah jeruk dapat menginduksi respon pertahanan pada sel tanaman dengan memicu peningkatan pengambilan Ca<sup>2+</sup> (Angelova dkk., 2006; Hahn dkk., 1981) dan mampu menginduksi perubahan permeabilitas membran plasma serta menambah level Ca<sup>2+</sup> pada sitoplasma (Sudha dan Ravishankar, 2003). Peningkatan metabolit sekunder dengan penambahan elisitor menyebabkan bertambahnya ion kalsium dalam sel yang akan berikatan dengan kalmodulin. Ikatan kalsium kalmodulin tersebut yang akan mengaktifasi enzim-enzim yang berperan dalam sintesis metabolit sekunder (Namdeo, 2007).

Penurunan kandungan flavonoid dan kuersetin yang terjadi terutama pada lama kultur 8 minggu diduga karena kalus masih terus mengalami perkembangan atau pertumbuhan dan pertumbuhan kalus belum mencapai fase stasioner sehingga produksi metabolit sekunder masih belum maksimal. Selain itu dikarenakan kalus telah mampu beradaptasi dengan adanya elisitor pektin yang diberikan dalam medium, sehingga pertumbuhannya mencapai puncak tetapi tidak memproduksi metabolit sekunder sebagai aksi pertahanan selnya.

Wang dkk. (2001), menyatakan bahwa elisitor dapat memainkan peran untuk menekan metabolisme primer dan digantikan dengan metabolisme sekunder. Hal yang berkebalikan juga terjadi antara pertumbuhan biomassa sel dengan akumulasi metabolit sekunder, pada saat elisitasi menekan pertumbuhan sel maka akan terjadi sintesis metabolit sekunder.

Elisitasi merupakan teknik untuk menjadikan tanaman dalam keadaan stres lingkungan untuk memicu akumulasi metabolit sekunder. Elisitor merupakan substansi yang diberikan pada konsentrasi kecil pada sel hidup yang akan meningkatkan biosintesis metabolit sekunder. Elisitor akan berinteraksi dengan reseptor membran tanaman dan menimbulkan sinyal yang akan mengaktifkan gen spesifik yang berperan dalam sintesis metabolit sekunder (Lila dkk., 2005).

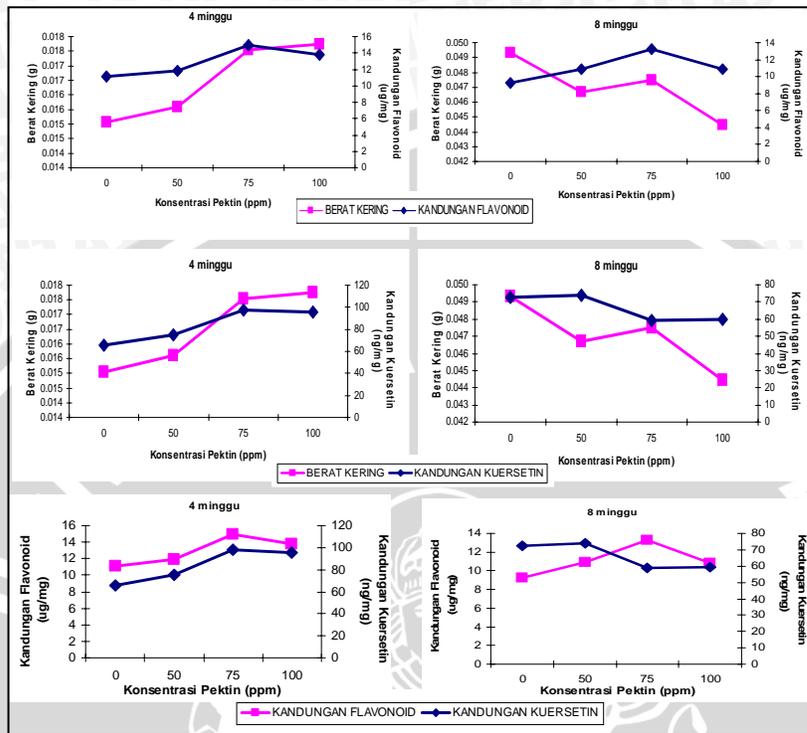
Bulgakov dkk. (2003) menyatakan bahwa sintesis metabolit sekunder dengan meningkatkan fitoaleksin merupakan salah satu fungsi protektif tanaman ketika ada beberapa patogen. Mekanisme pertahanan tanaman meliputi deteksi sinyal patogen, aktivasi H<sup>+</sup>-ATPase, peningkatan aliran kalsium ke dalam sel, aktivasi CDPK (*calcium-dependent protein kinase*), dan aktivasi NADPH oksidase. Radikal oksigen yang aktif dihasilkan oleh NADPH oksidase yang akan mengaktifkan MAP kinase sehingga terjadi peningkatan tingkat ekspresi gen biosintesis metabolit sekunder.

#### **4.3 Hubungan Antara Berat Kering dengan Kandungan Flavonoid, Berat Kering dengan Kandungan Kuersetin, dan Kandungan Flavonoid dengan Kandungan Kuersetin pada Kalus Teh**

Hubungan antara berat kering kalus pada seluruh medium perlakuan dengan kandungan flavonoid pada lama kultur 4 dan 8 minggu cenderung berbanding lurus, yakni pada saat berat kering kalus tinggi maka kandungan flavonoidnya juga tinggi. Akan tetapi pada medium dengan penambahan pektin 100 ppm pada lama kultur 4 minggu tingginya berat kering kalus disertai kandungan flavonoid yang rendah, hal tersebut juga terjadi pada medium kontrol yang dikultur selama 8 minggu (Gambar 4.7).

Pada lama kultur 4 minggu hubungan antara berat kering kalus pada seluruh medium perlakuan berbanding lurus dengan kandungan

kuersetinnya. Sedangkan pada lama kultur 8 minggu, berat kering kalus pada seluruh medium perlakuan berbanding terbalik dengan kandungan kuersetin, dimana pada saat terjadi sedikit peningkatan berat kering kalus maka kandungan kuersetin cenderung mengalami penurunan ataupun sebaliknya (Gambar 4.7).



Gambar 4.7 Hubungan antara berat kering dengan kandungan flavonoid, berat kering dengan kandungan kuersetin, dan kandungan flavonoid dengan kandungan kuersetin pada kalus teh selama 4 dan 8 minggu.

Pada lama kultur 4 minggu, kandungan flavonoid berbanding lurus dengan kandungan kuersetin. Sedangkan pada lama kultur 8 minggu hubungan antara kandungan flavonoid dengan kandungan kuersetin adalah berbanding terbalik, yakni pada saat terjadi

peningkatan kandungan flavonoid maka terjadi penurunan kandungan kuersetin ataupun sebaliknya (Gambar 4.7).

Hubungan antara berat kering dan kandungan flavonoid maupun kuersetin yang berbanding lurus ditunjukkan dengan meningkatnya berat kering yang diikuti juga peningkatan kandungan flavonoid dan kuersetin. Hal tersebut menunjukkan bahwa elisitor pektin mampu meningkatkan pertumbuhan kalus juga mampu meningkatkan kandungan metabolit sekunder flavonoid dan kuersetin. Wang dkk. (2001), menyatakan bahwa pola produksi metabolit sekunder yang sejalan dengan pola pertumbuhan diduga disebabkan pada tahap ini terjadi proses metabolisme primer yang sangat aktif. Tersedianya hasil metabolisme primer dalam jumlah cukup dapat digunakan sebagai prekursor untuk sintesis metabolit sekunder.

Hubungan antara berat kering kalus dengan kandungan flavonoid dan kuersetin yang berbanding terbalik menunjukkan terjadinya persaingan antara pembentukan metabolisme primer dan metabolisme sekunder. Selain itu dikarenakan komponen medium digunakan untuk proses pertumbuhan atau membentuk metabolit primer sehingga tidak meningkatkan kandungan metabolit sekundernya. Elisitor yang menekan pertumbuhan kalus menyebabkan sel mensintesis metabolit sekunder berlebih sebagai mekanisme pertahanan sel tersebut sehingga jumlah metabolit sekunder meningkat. Taiz dan Zeiger (2002), menyatakan bahwa jika berat kalus tinggi, nutrisi yang diperoleh cenderung digunakan untuk mensintesis metabolit primer dan sebaliknya pada saat pertumbuhan kalus lambat (memiliki berat yang rendah) maka nutrisi digunakan untuk mensintesis metabolit sekunder, sehingga kandungan metabolit sekundernya relatif lebih tinggi.

Peningkatan kandungan flavonoid dan kandungan kuersetin kalus yang sebanding pada umur 4 minggu menunjukkan bahwa elisitor pektin mempengaruhi sintesis keduanya yang diduga terjadi peningkatan sintesis enzim untuk memproduksi metabolit sekunder flavonoid dan kuersetin seperti Phenylalanine ammonia lyase (PAL) maupun Flavonol Synthase (FLS). Adanya peningkatan kandungan flavonoid yang diikuti penurunan kandungan kuersetin kalus pada umur 8 minggu berarti pada saat tersebut diduga terjadi sintesis metabolit sekunder dari golongan flavonoid yang lain sehingga kandungan kuersetinnya menurun.

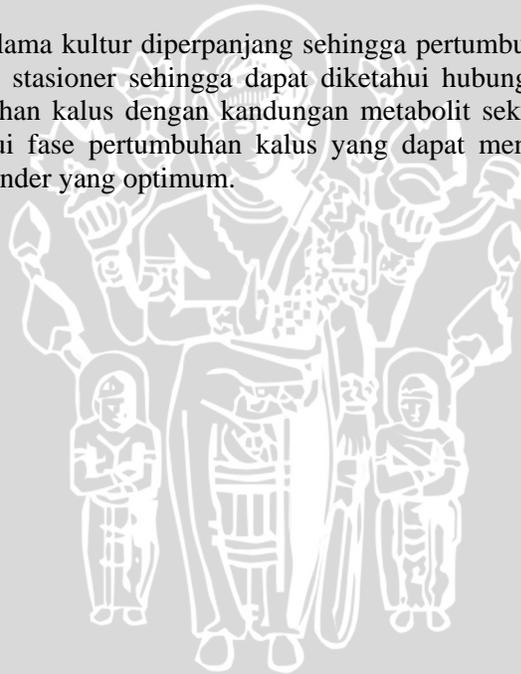
## BAB V PENUTUP

### 5.1 Kesimpulan

Penambahan pektin hingga konsentrasi 100 ppm pada media tidak berpengaruh terhadap pertumbuhan kalus teh, meskipun ada kecenderungan peningkatan berat basah kalus dibandingkan dengan kontrol. Peningkatan pertumbuhan kalus teh pada medium kontrol dan medium perlakuan dengan penambahan pektin secara signifikan mulai tampak setelah 4 minggu kultur dan pertumbuhan kalus teh selama 8 minggu kultur masih dalam fase eksponensial. Konsentrasi elisitor pektin tidak berpengaruh terhadap kandungan flavonoid dan kuesetin kalus teh meskipun ada kecenderungan peningkatan kandungan flavonoid dan kuersetin kalus teh. Kandungan flavonoid dan kuersetin kalus teh yang dikultur selama 4 minggu lebih tinggi daripada kandungan flavonoid dan kuersetin kalus teh yang dikultur selama 8 minggu, tetapi hal tersebut tidak signifikan pada kandungan flavonoid kalus teh.

### 5.2 Saran

Sebaiknya lama kultur diperpanjang sehingga pertumbuhan kalus mencapai fase stasioner sehingga dapat diketahui hubungan antara fase pertumbuhan kalus dengan kandungan metabolit sekunder dan dapat diketahui fase pertumbuhan kalus yang dapat menghasilkan metabolit sekunder yang optimum.



## DAFTAR PUSTAKA

- Angelova Z., S. Georgiev, dan W. Roos. 2006. Elicitation of Plant. *Biotechnol. & Biotechnol.* 72-83.
- Benhamou, N. 1996. Elicitor-induced Plant Defence Pathways. *Elsevier Science Ltd.* 1: 233 – 240.
- Bulgakov, V. P., G. K. Tchernoded, N. P. Mischenko, Yu. N. Shkryl, V. P. Glazunov, S. A. Fedoreyev dan Yu. N. Zhuravlev. 2003. Increase in Anthraquinone Content in *Rubia cordifolia* Cells Transformed by *rol* Genes Does Not Involve Activation of the NADPH Oxidase Signaling Pathway. *Biochemistry (Moscow)*. 68 (7): 795-801.
- Chalimah, S. 2004. Teh sebagai Minuman Kesehatan. [http://www.iptek.net.id/ind/pustaka\\_pangan/pdf/prosiding/poster/PGB02\\_Dadan-Bandung2.pdf](http://www.iptek.net.id/ind/pustaka_pangan/pdf/prosiding/poster/PGB02_Dadan-Bandung2.pdf). Tanggal akses 16 Juli 2007.
- Chawla, H. S. 2002. Introduction to Plant Biotechnology. Science Publisher, Inc. USA.
- Engelhardt, U., Finger, A., Herzig, B. dan Kuhr, S. 1992. Determination of flavonol glycosides in black tea. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*. 88: 69–73.
- Erlund, I. 2002. Chemical Analysis and Pharmacokinetics of the Flavonoids Kuersetin, Hesperetin and Naringenin in Humans. Academic Dissertation. University of Helsinki.
- Evans, D. E., J. O. D. Coleman, dan A. Kearns. 2003. Plant Cell Culture. Bios Scientific Publisher. New York.
- Fitriani, A. 2003. Kandungan Ajmalisin Pada Kultur Kalus *Catharanthus Roseus* (L.) G. Don Setelah Dielisisasi Homogenat Jamur *Pythium aphanidermatum* Edson Fitzp. [http://tumoutou.net/6\\_sem2\\_023/any\\_fitriani.htm](http://tumoutou.net/6_sem2_023/any_fitriani.htm). Tanggal akses 30 September 2007.

- Hahn, M. G., A. G. Darvill, dan P. Albersheim. 1981. Host-Pathogen Interactions. The Endogenous Elicitor, A Fragment Of Plant Cell Wall Polysaccharide That Elicits Phytoalexin Accumulation In Soybeans. *Plant Physiol.* 68: 1161-1169.
- Hanafy, M. S. dan M. A. S. Lobna. 2007. Saponin Production in Shoot and Callus Cultures of *Gypsophila paniculata*. *Jurnal of Applied Science Research.* 3(10): 1045-1049.
- Herbert, R. B. 1995. Biosintesis Metabolit Sekunder. Edisi kedua. Alih Bahasa: Bambang Srigandono. IKIP Semarang Press. Semarang.
- Jedinak, A., J. Farago, I. Psenakova, dan T. Maliar. 2004. Approach to Flavonoid Production in Plant Tissue Culture. *Biologia Bratislava.* 59: 697 – 710.
- Kongkow. 2007. *Camelia sinensis*. <http://kongkow.info/index.php?PHPSESSID=07beec0a79fe7b3adcf8fdb44f2b1570&topic=1784.msg20458#msg20458>. Tanggal akses 16 Juli 2007.
- Kracoff, G. 2001. Kuersetin. <http://www.umm.edu/altmed/articles/kuersetin-000322.htm>. Tanggal akses 11 Februari 2008.
- Lakhanpal, P. dan D. K. Rai. 2007. Quercetin: A Versatile Flavonoid. *Internet Journal of Medical Update.* 2: 1 - 12.
- Lamson, D. W. dan M. S. Brignall. 2000. Antioxidants and Cancer III:Kuersetin. *Alternative Medicine Review.* 5(3):196-208.
- Leny, S. 2006. Senyawa Flavonoida, Fenilpropanoida, dan Alkaloida. USU Repository. Medan.
- Lila, M. N., G. G. Yousef, Y. Jiang, dan C. M. Weaver. 2005. Sorting Out Bioactivity in Flavonoid Mixtures. *The Journal of Nutrition.* 135: 1231-1235.
- Litz, R.E., P.A. Moon, dan V.M. Chavez, 1995. Somatic embryogenesis from leaf callus derived from mature trees of the cycad *Ceratozamia hildae* (Gymnospermae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 40 :25-31.

- Mathius, N. T., Reflini, N. Haris, J. Santoso, dan A. P. Roswiem. 2004. Kultur Akar Rambut *Cinchona ledgeriana* dan *C. Succirubra* dalam Kultur *in vitro*. *Menara Perkebunan*. 2:72-87.
- Mukarlina, R., R. Esyanti, dan A. H. Siregar. 2006. Pengaruh Pemberian Elisitor Homogenat Jamur *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp. terhadap Kandungan Ajmalisin dalam Kultur Akar *Catharantus roseus* (L) G. Don. *Jurnal Matematika dan Sains*. 11:44-49.
- Murch S. J., K. Ray dan P. K. Saksena. 2000. Tryptophan is a precursor for malatonin and serotonin biosynthesis in vitro generated St.John's wort. *Plant Cell Rep*. 19: 698-704.
- Murthihapsari. 2008. Analisis Senyawa Kuersetin Bawang Bombay *Allium Cepa* Melalui Uji Multifragmen Separatif Dan Spektrofotometris. F-MIPA. Papua Barat.
- Namdeo, A. G. 2007. Plant Cell Elicitacion for Production of Secondary Metabolites. *Pharmacognosy Reviews*. 1(1): 69-78.
- Nothnagel, E. A., M. Mcneil, P. Albersheim<sup>2</sup>, dan A. Dell. 1982. Host-Pathogen Interactions. *J. Plant Physiol*. 71:916-926.
- Olthof, M. R., P. C. H. Hollman, T. B. Vree dan M. B. Katan. 2000. Bioavailabilities of Quercetin-3-Glucoside and Quercetin-4\*-Glucoside Do Not Differ in Humans. *The Journal of Nutrition*. 130: 1200 – 1203.
- Pambudi, J. 2000. Potensi teh sebagai sumber zat gizi dan peranannya dalam kesehatan. <http://members.bumn-ri.com/ptpn9/news.html>. Tanggal akses 16 Juli 2007.
- Pande P., S. Malik, M. Bora dan P. S. Srivastava. 2002. Rapid protocol for *in vitro* propagation of *Lepidium sativum* Linn and enhancement in the yield of lepidine. *In vitro Cell Dev Biol Plant*. 38: 451-455.

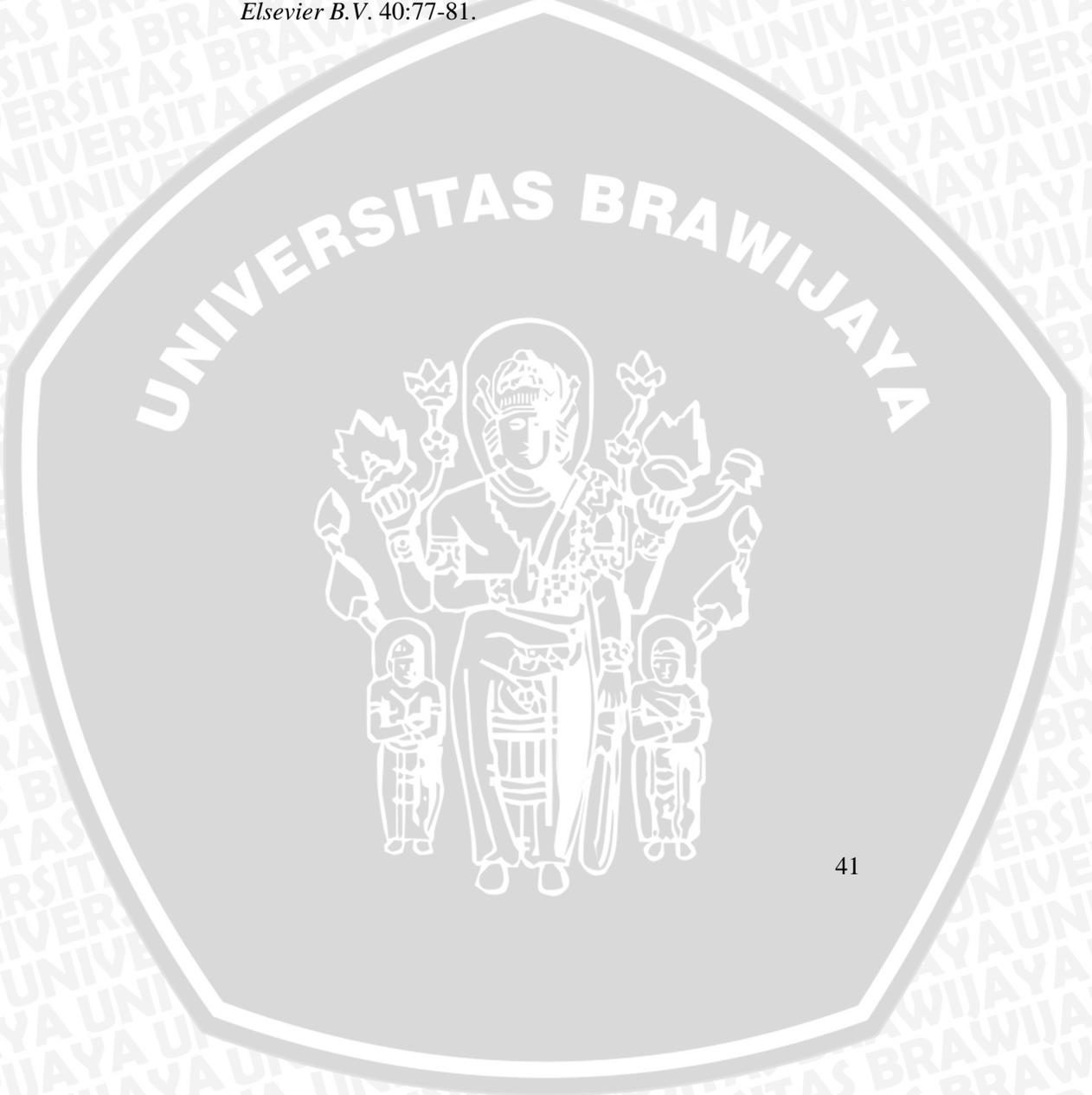
- Pradel H., U. Dumkelehmman, B. Diettrich, dan M. Luckner. 1997. Hairy root cultures of *Digitalis lanata*. Secondary metabolism and plant regeneration. *J. Plant Physiol.* 151: 209-215.
- Punyasiri, P.A.N., I.S.B. Abeysinghe, V. Kumar, D. Treutter, D. Duy, C. Gosch, S. Martens, G. Forkmann, dan T.C. Fischer. 2004. Flavonoid biosynthesis in the tea plant *Camellia sinensis*: properties of enzymes of the prominent epicatechin and catechin pathways. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 431: 22–30.
- Radmanm, R., T. Saez, C. Bucke, dan T. Keshavarz. 2000. Elicitation of Plant and Microbial System. *Fungal Biotechnology Research Group.* 59: 86-95.
- Rahayu, L. 2006. Perbandingan Kandungan Tanin dalam Kalus dan Daun Teh (*Camelia sinensis* (L.) O. Kuntze) Tri 2025. <http://152.118.80.2/opac/themes/libri2/detail.jsp?id=77057&lokasi=lokal>. Tanggal akses 8 Juli 2008.
- Rao, R. 2002. Biotechnological Production of Phytopharmaceuticals. *J.Biochem. Mol. Bio. Biophys.* 4:73-102.
- Ravishankar G. A. dan S. Grewal. 1991. Development of media for growth of *Dioscorea deltoidea* cells and in vitro diosgenin production: Influence of media constituents and nutrient stress. *Biotechnol. Lett.* 13: 125-130.
- Roberts, S. C. 2007. Production and Engginering of Terpenoids in Plant Cell Culture. *Nature Chemical Biology.* 3: 387 – 393.
- Robins, R. J. 2004. Secondary Protein from Cultured Cell and Organs : Plant Cellular Cultures. A practical Approach. Second Edition. Oxford University press. New York.
- Ruyack, J., M. R. Downing, J. S. Chang, dan E. D. Mitchell. 2007. Growth Of Callus And Suspension Culture Cells From Cotton Varieties (*Gossypiumhirsutum* L.) Resistant And Susceptible To *Xanthomonas Malvacearum* (E. F. Sm.) Dows. *In Vitro.* 5: 368 – 373.

- Setiawati, Tia. 2006. Pengaruh pemberian elisitor yang berasal dari jamur *Verticilium dahliae kleb.* terhadap kandungan gospol dalam kultur akar kapas. *Master Theses from PUBLISHER* 11: 11-19.
- Srividya N. dan B. P. S. Devi. 1998. Azadirachtin and nimbin content in in vitro cultured shoots and roots of *Azadirachta indica* A. *Juss Indian. J Plant Physiol.* 3: 129-34.
- Sudha, G. dan Ravishankar. 2002. Influence of Calcium Channel Modulators in Capsaicin Production by Cell Suspension Cultures of *Capsicum frutescens* Mill. *Research Comm.* 83 (4): 480-484.
- Sumaryono dan I. Riyadi. 2005. Pertumbuhan Biak Kalus dan Suspensi Sel Tanamn Kina (*Cinchona ledgeria* Moens). *Menara Perkebunan.* 73(1): 1-11.
- Syahid, S. F. dan N. N. Kristina. 2007. Induksi dan Regenerasi Klus Keladi Tikus (*Typonium flagelliforme*. Lodd.) secara In Vitro. *Jurnal Littri* 13(4): 142-146.
- Synder, M. 2008. Kuersetin. <http://www.umm.edu/altmed/articles/kuersetin-000322.htm>. Tanggal akses 28 Januari 2008.
- Taiz, L. dan E. Zeiger. 2002. *Plant Physiology*, 3<sup>rd</sup> Edition. Sinauer Associated. USA.
- Tuminah, S. 1999. Pencegahan Kanker dengan Antioksidan. *Cermin Dunia Kedokteran.* 122: 21 – 23.
- Wang, C., J. Wu, dan X. Mei. 2001. Enhancement of Taxol production and excretion in *Taxus chinensis* cell culture by fungal elicitation and medium renewal. *Appl Microbiol Biotechnol.* 55: 404-410.
- Weatehrby C. 2007. Green Tea Seen to Save Lives in Large, Lengthy Study. [http://newsletter.vitalchoice.com/e\\_article000669434.cfm?](http://newsletter.vitalchoice.com/e_article000669434.cfm?). Tanggal akses 16 Juli 2007.
- Whin, W. 2005. Cancer. <http://innchannels.com/news>. Tanggal akses 05 Februari 2008.

Wikipedia. 2007. Flavonoid. <http://en.wikipedia.com/flavonoid>.  
Tanggal akses 25 Desember 2007.

Winata, L. G. 1992. Teknik Kultur Jaringan Tumbuhan. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan. Dirjen Perguruan Tinggi PAK Bioteknologi IPB. Bogor.

Yamamoto, H., M. Ichimura dan K. Inoue. 2000. Stimulation of prenylated flavanone production by mannans and acidic polysaccharides in callus culture of *Sophora flavescens*. *Elsevier B.V.* 40:77-81.



## LAMPIRAN

## Lampiran 1. Komposisi Media Induksi dan Media Elisistasi

Tabel 1. Komposisi larutan stok media MS (Murashige Skoog, 1962) dalam volume 100 ml

Larutan Stok	Nama Bahan	Berat untuk 100 ml (g)	Pengambilan untuk 1 L media (ml)
A (5x)	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	8,25	20
B (5x)	KNO <sub>3</sub>	9,5	20
C (10x)	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	4,4	10
D (10x)	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	3,7	10
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,7	
E (20x)	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,56	5
	Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	0,75	
F (20x)	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,12	5
	MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,446	
	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,17	
G (200x)	KI	0,2	0,5
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,05	
	CuCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,005	
	CoSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,005	
Vitamin (100x)	Nicotinic Acid	0,1	1
	Pyridoxine HCl	0,1	
	Thiamin HCl	1	
Myo (10x)	Myo inositol	1	10
Zat Pengatur Tumbuh	2,4 D	0,1	1
	Kinetin	0,1	1

Tabel 2. Konsentrasi pektin pada media dasar MS

Konsentrasi Pektin	Pengambilan untuk 1L media MS (g)
50 ppm	0,050
75 ppm	0,075
100 ppm	0,100

**Lampiran 2. Pengaruh Pektin terhadap Pertumbuhan, Berat Basah, dan Berat Kering Kalus Teh selama 8 Minggu**

Tabel 1. Pengaruh elisitor pektin terhadap pertumbuhan kalus teh selama 8 minggu

Konsentrasi Elisitor (ppm)	Lama Kultur (minggu)	Rata-rata berat basah (g) ± SD (n=10)
0	0	0.040±0.000
	2	0.063±0.009
	4	0.124±0.031
	6	0.199±0.069
	8	0.310±0.131
50	0	0.040±0.117
	2	0.066±0.000
	4	0.139±0.001
	6	0.216±0.016
	8	0.372±0.042
75	0	0.040±0.125
	2	0.065±0.133
	4	0.140±0.000
	6	0.246±0.008
	8	0.454±0.024
100	0	0.040±0.056
	2	0.071±0.090
	4	0.145±0.016
	6	0.232±0.000
	8	0.366±0.010

Tabel 2. Pengaruh elisitor pektin dan lama kultur terhadap berat basah dan berat kering kalus teh

Lama Kultur (minggu)	Konsentrasi Elisitor (ppm)	Berat Basah (g) ± SD (n=10)	Berat Kering (g) ± SD (n=10)
4	0	0.104±0.036	0.015±0.004
	50	0.137±0.028	0.016±0.004
	75	0.142±0.020	0.018±0.002
	100	0.157±0.067	0.018±0.002
8	0	0.431±0.067	0.049±0.007
	50	0.433±0.044	0.047±0.005
	75	0.440±0.062	0.047±0.005
	100	0.393±0.030	0.044±0.004

### Lampiran 3. Pengaruh Pektin terhadap Kandungan Flavonoid dan Kuersetin pada Kalus Teh

Tabel 1. Pengaruh Pektin terhadap Kandungan Flavonoid pada kalus teh selama 8 Minggu

Lama Kultur (minggu)	konsentrasi (ppm)	absorbansi	% Flavonoid	Kadar Flavonoid ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) $\pm$ SD (n=2)
4	0	0.415	0.013	11.1 $\pm$ 1.85
	50	0.436	0.014	11.9 $\pm$ 0.50
	75	0.422	0.013	15.0 $\pm$ 0.17
	100	0.444	0.014	13.8 $\pm$ 2.15
8	0	0.329	0.010	9.2 $\pm$ 3.84
	50	0.352	0.011	10.9 $\pm$ 1.85
	75	0.421	0.013	13.3 $\pm$ 0.60
	100	0.349	0.011	10.9 $\pm$ 0.85

Rumus perhitungan kadar flavonoid (Yuliana dkk., 2003)

$$\% \text{ flavonoid} = A \times 0,735/G$$

Keterangan :

A = absorbansi sampel

G = berat kering sampel dalam g

=  $(100 - KA)\% \times W$

KA = susut pengeringan ( $W_{70^\circ} - W_{110^\circ}/W_{70^\circ}$ )

W = berat sampel sesuai dengan penimbangan dalam g

Tabel 2. Pengaruh Pektin terhadap Kandungan Kuersetin pada kalus teh selama 8 Minggu

Lama Kultur (minggu)	konsentrasi (ppm)	luas area	Kw (ng)	KQ (ng/mg) $\pm$ SD (n=10)
4	0	0.10	1225	65.8 $\pm$ 3.79
	50	0.14	1425	75.3 $\pm$ 14.95
	75	0.22	1825	97.9 $\pm$ 3.79
	100	0.22	1800	95.4 $\pm$ 1.87
8	0	0.13	1350	72.5 $\pm$ 5.69
	50	0.14	1425	74.0 $\pm$ 13.08
	75	0.08	1100	59.0 $\pm$ 1.89
	100	0.17	1575	59.6 $\pm$ 3.75

Rumus perhitungan kadar kuersetin

$$KQ = \frac{\frac{V_{ext} \times Kw(ng)}{V_{tot}}}{\text{Berat Sampel (mg)}} \times \frac{100 \%}{100 - KA}$$

$V_{ext}$  = Volume ekstrak

$V_{tot}$  = Volume totalan

$Kw$  = Konsentrasi kuersetin hasil perhitungan dari standar  
 =  $\frac{\text{luas area sampel} + 0,145}{0,0002}$

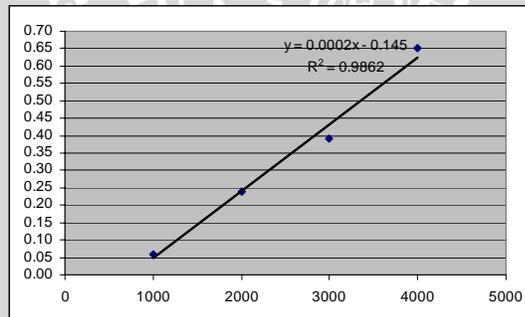
$$KA = \frac{W_{70^\circ} - W_{110^\circ}}{W_{70^\circ}} \times 100 \%$$

$W_{70^\circ}$  = Kalus dioven pada suhu 70°C selama 2 hari

$W_{110^\circ}$  = Kalus kering dioven pada suhu 110°C selama 24 jam

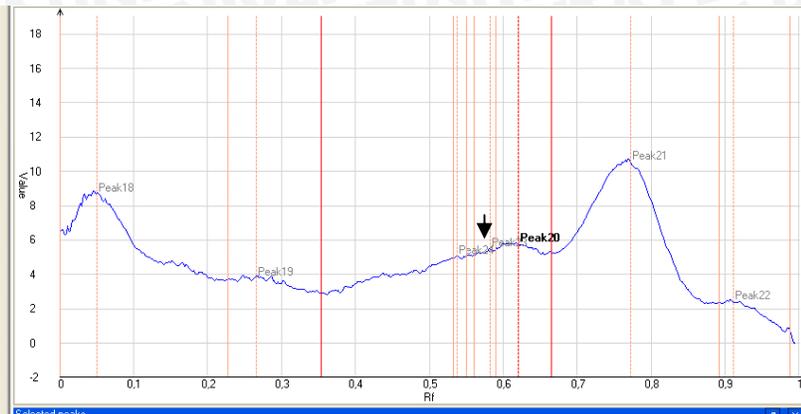


Gambar 1. KLT Senyawa Standar Kuersetin. Konsentrasi 1000 ng (a); 2000 ng (b); 3000 ng (c); 4000 ng (d)

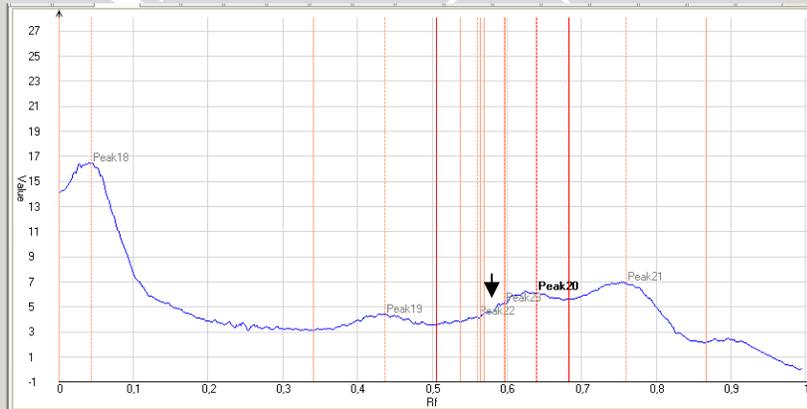


Gambar 2. Kurva Standar Senyawa Kuersetin

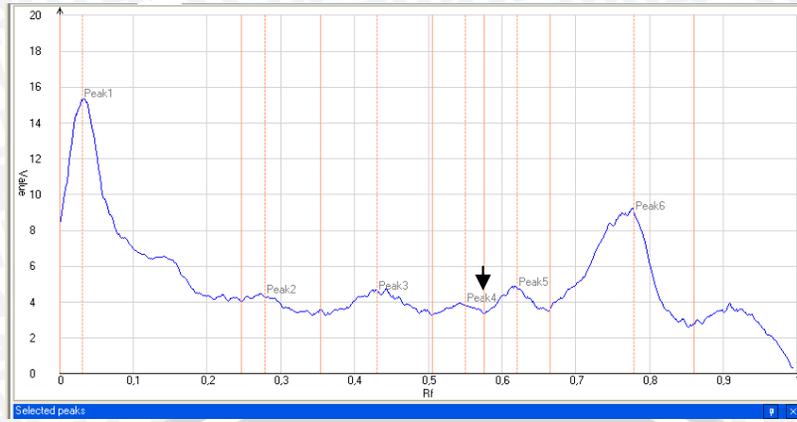
Lampiran 4. Hasil Analisis Kandungan Kuersetin dengan Program TLSee



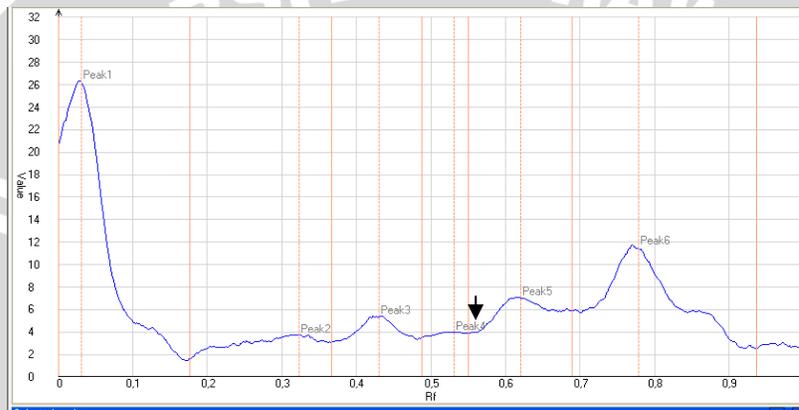
Gambar 3. Analisis KLT senyawa kuersetin pada kalus teh konsentrasi 0 ppm pektin pada lama elisitasi 4 minggu



Gambar 4. Analisis KLT senyawa kuersetin pada kalus teh konsentrasi 50 ppm pektin pada lama elisitasi 4 minggu

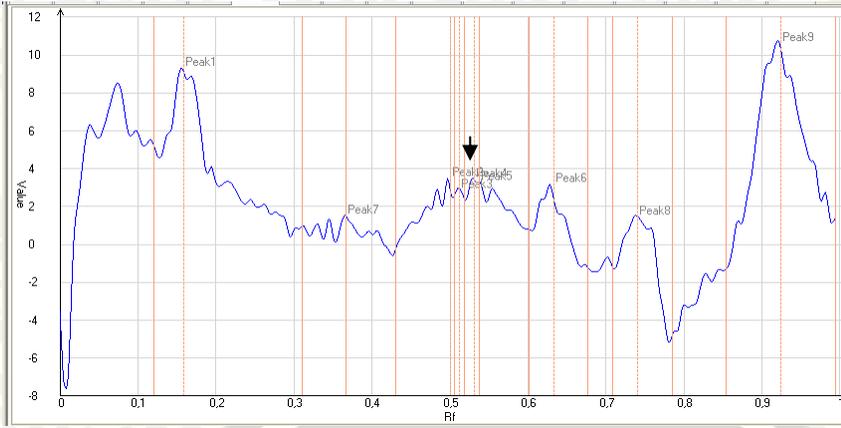


Gambar 5. Analisis KLT senyawa kuersetin pada kalus teh konsentrasi 75 ppm pektin pada lama elisitasi 4 minggu

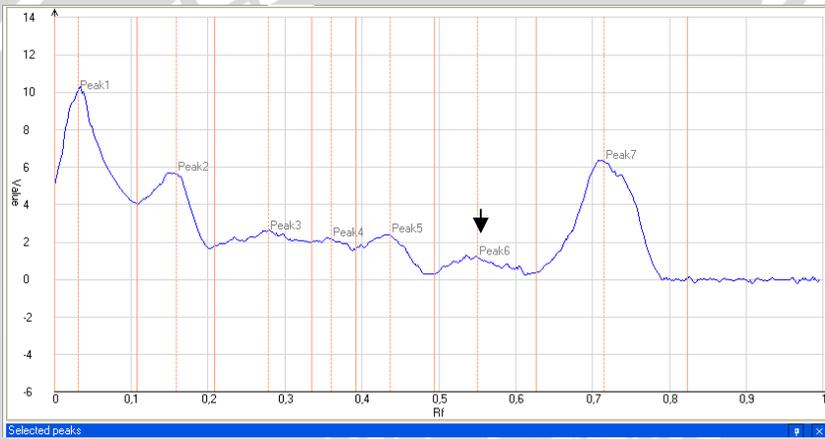


Gambar 6. Analisis KLT senyawa kuersetin pada kalus teh konsentrasi 100 ppm pektin pada lama elisitasi 4 minggu

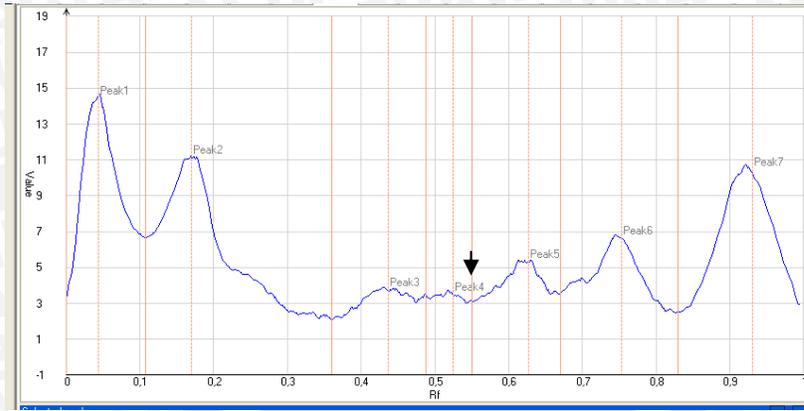




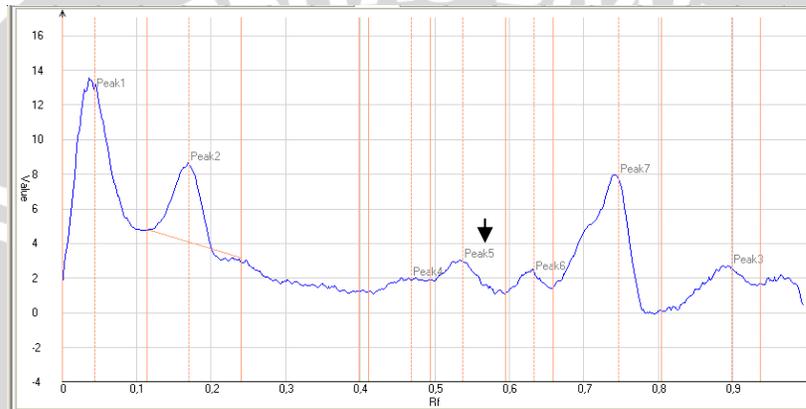
Gambar 7. Analisis KLT senyawa kuersetin pada kalus teh konsentrasi 0 ppm pektin pada lama elisitasi 8 minggu



Gambar 8. Analisis KLT senyawa kuersetin pada kalus teh konsentrasi 50 ppm pektin pada lama elisitasi 8 minggu



Gambar 9. Analisis KLT senyawa kuersetin pada kalus teh konsentrasi 75 ppm pektin pada lama elisitasi 8 minggu



Gambar 10. Analisis KLT senyawa kuersetin pada kalus teh konsentrasi 100 ppm pektin pada lama elisitasi 8 minggu



## Lampiran 5. Analisis Statistik

Tabel 1. Analisa ragam pengaruh konsentrasi Pektin terhadap pertumbuhan kalus (Laju Pertumbuhan Kalus)

Sumber Keragaman	JK	db	KT	Fhit	Sig.*
interaksi	.030	12	.003	.696	.748
konsentrasi	.018	3	.006	1.619	.195
Lama elisitasi	1.119	4	.280	77.222	.000
Galat	.207	57	.004		
Total	1.388	76			

\* Nilai dianggap signifikan jika kurang dari 0.05

Tabel 2. Analisa ragam pengaruh konsentrasi pektin terhadap berat basah kalus

Sumber Keragaman	JK	db	KT	Fhit	Sig.*
Interaksi	.022	3	.007	4.053	.010
konsentrasi	.006	3	.002	1.118	.348
Lama elisitasi	1.626	1	1.626	893.640	.000
Galat	.127	70	.002		
Total	1.776	77			

\* Nilai dianggap signifikan jika kurang dari 0.05

Tabel 3. Analisa ragan pengaruh konsentrasi pektin terhadap berat kering kalus

Sumber Keragaman	JK	db	KT	FHIT	Sig.*
Interaksi	.000	3	4.98E-005	2.261	.089
konsentrasi	3.29E-005	3	1.10E-005	.498	.685
Lama elisitasi	.018	1	.018	821.522	.000
Galat	.002	70	2.20E-005		
Total	.020	77			

\* Nilai dianggap signifikan jika kurang dari 0.05

Tabel 4. Analisa ragam pengaruh konsentrasi pektin terhadap kadar flavonoid pada kalus teh

Sumber Keragaman	JK	df	Mean Square	F	Sig.*
interaksi	2.150	3	.717	.208	.888
konsentrasi	33.175	3	11.058	3.209	.083
Lama elisitasi	13.969	1	13.969	4.054	.079
Galat	27.567	8	3.446		
Total	76.861	15			

\* Nilai dianggap signifikan jika kurang dari 0.05

Tabel 5. Analisa ragam pengaruh konsentrasi pektin terhadap kadar kuersetin pada kalus teh

Sumber Keragaman	JK	db	KT	Fhit	Sig.*
Interaksi	1682.581	3	560.860	8.472	.007
Konsentrasi	208.124	3	69.375	1.048	.423
Lama elisitasi	1153.757	1	1153.757	17.429	.003
Galat	529.595	8	66.199		
Total	3574.057	15			

\* Nilai dianggap signifikan jika kurang dari 0.05

