

**PENGARUH  $Mn^{2+}$  TERHADAP KANDUNGAN QUERSETIN  
PADA KALUS TEH (*Camellia sinensis* L. O. Kuntze)**

**SKRIPSI**

**Oleh:  
ASTI DWI HARYANTI  
0410910007-91**



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

## LEMBAR PENGESAHAN

**Pengaruh  $Mn^{2+}$  Terhadap Kandungan Kuersetin Pada Kalus  
Teh (*Camellia sinensis* L. O Kuntze)**

**oleh:**

**Asti Dwi Haryanti  
0410910007**

**Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji  
Pada tanggal 23 Desember 2008  
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Sains dalam bidang Biologi**

**Dosen Penguji I**

**Dosen Penguji II**

Dr. Wahyu Widoretno, MSi  
NIP. 131 837 696

Ir. Retno Mastuti, MAg. Sc. DAg.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 : Asti Dwi Haryanti  
NIM : 0410910007  
Jurusan : Biologi  
Penulis Tugas Akhir berjudul : Pengaruh  $Mn^{2+}$  Terhadap  
Kandungan Kuersetin Pada Kalus Teh (*Camellia sinensis* L. O  
Kuntze)

Dengan ini menyatakan bahwa:

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

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran

Malang, 23 Desember 2008  
Yang Menyatakan

Asti Dwi Haryanti  
NIM. 0410910007

# **PENGARUH $Mn^{2+}$ TERHADAP KANDUNGAN KUERSETIN PADA KALUS TEH (*Camellia sinensis* L. O. Kuntze)**

Asti Dwi Haryanti, Wahyu Widoretno, Retno Mastuti  
Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Universitas Brawijaya, Malang, 2008

## **Abstrak**

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh  $Mn^{2+}$  terhadap pertumbuhan kalus teh selama 8 minggu serta kandungan flavonoid dan kuersetin kalus pada 4 dan 8 minggu. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial dengan 2 faktor yaitu konsentrasi logam  $Mn^{2+}$  (1, 5 dan 10 mg/L) dan lama kultur (4 dan 8 minggu). Elisitasi kalus dilakukan pada media induksi (MS + 2,4 D + kinetin masing-masing 1 mg/L) yang ditambahkan dengan  $Mn^{2+}$  dengan beberapa konsentrasi. Kalus diperoleh dari hasil induksi yang berasal dari eksplan daun teh. Pertumbuhan kalus diukur dengan menimbang berat basah kalus setiap 2 minggu sekali selama 8 minggu. Pengukuran kandungan flavonoid dan kuersetin dilakukan pada kalus yang telah dielisitasi selama 4 dan 8 minggu. Data yang diperoleh dianalisis dengan anova. Apabila terdapat beda, maka dilanjutkan dengan uji Duncan. Pertumbuhan kalus teh tidak dipengaruhi oleh pemberian  $Mn^{2+}$ , namun lebih dipengaruhi oleh lama kultur. Pertumbuhan kalus mulai meningkat pada 2 minggu setelah kultur, pada umur 8 minggu kalus masih dalam fase linear. Berat basah dan berat kering kalus pada lama kultur 8 minggu lebih tinggi jika dibandingkan dengan kalus pada lama kultur 4 minggu. Pemberian eisor  $Mn^{2+}$  dapat meningkatkan kandungan kuersetin kalus teh namun tidak berpengaruh pada kandungan flavonoid. Penambahan  $Mn^{2+}$  sebanyak 5 mg/L dapat meningkatkan kandungan kuersetin kalus sebanyak hampir  $\frac{1}{2}$  kali jika dibandingkan kalus pada media kontrol. Kandungan flavonoid dan kuersetin kalus teh pada media kontrol dan perlakuan  $Mn^{2+}$  selama 8 minggu lebih tinggi jika dibandingkan dengan 4 minggu.

**Kata kunci:** Flavonoid, Kalus,  $Mn^{2+}$ , Kuersetin, *Camellia sinensis* L. O. Kuntze

# THE EFFECT OF $Mn^{2+}$ ON THE CONTENT OF QUERCETIN IN CALLUS OF TEA (*Camellia sinensis* L. O. Kuntze)

Asti Dwi Haryanti, Wahyu Widoretno, Retno Mastuti  
Biology Departement, Faculty of Mathematic and Science  
Brawijaya University, Malang, 2008

## Abstract

The objectives of the research were to know the effect of  $Mn^{2+}$  on the growth of tea callus during 8 weeks and the content of flavonoid and quercetin in 4 and 8 weeks old tea callus. The design of the research was factorial Completely Randomize Design with two factors which were the concentration of  $Mn^{2+}$  (1, 5 and 10 mg/L) and the length of culture (4 and 8 weeks). Elcitation was carried out by culturing of callus on induction media (MS + 2,4 D kinetin both of them 1 mg/L) that added by  $Mn^{2+}$  on various concentration. Callus was induced from tea leaves explant. The growth of the callus was measured by weighing the fresh weight of callus every two weeks for eight weeks. Flavonoid and quercetin content was analyzed from the callus which had been elicited for 4 and 8 weeks. The data was analyzed with Anova if there was a significant difference, it will be continued with Duncan test. Addition of  $Mn^{2+}$  on media has no effect on flavonoid content in tea callus. The growth of callus started to increase in afther 2 weeks of culture, and in 8 weeks callus still on linear phase. Fresh weight and dry weight of callus on media with 8 weeks length of culture were higher than 4 weeks. The addition of  $Mn^{2+}$  increased the content of quercetin in tea callus but it did not affect the flavonoid content. The concentration of 5 mg/L of  $Mn^{2+}$  increased the content of quercetin callus almost 0,5 fold compare to the callus in control media. Callus flavonoid and quercetin content on control and treatment media with  $Mn^{2+}$  for 8 weeks length of culture were higher than 4 weeks.

**Key Word:** Flavonoid, Callus,  $Mn^{2+}$ , Quercetin, *Camellia sinensis*  
L. O. Kuntze



## KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, segala puji syukur kepada Allah SWT atas segala nikmat dan ridhoNya serta bimbingan Nabi Muhammad SAW, sehingga tugas akhir dengan judul "Pengaruh  $Mn^{2+}$  Terhadap Kandungan Kuersetin Kalus Teh (*Cammellia sinensis* L. O. Kuntze)", sebagai salah satu syarat memperoleh gelar Sarjana Sains dalam bidang Biologi dapat diselesaikan.

Dalam penulisan tugas akhir ini tidak terlepas dari bantuan berbagai pihak, oleh karena itu penulis mengucapkan terima kasih sebesar-besarnya kepada:

1. Dr. Wahyu Widoretno, MSi, selaku dosen Pembimbing I dan Ir. Retno Mastuti. Mag. Sc. Dag. Sc, yang telah berkenan memberikan bimbingan, ilmu, kesabaran serta saran yang membangun dan sangat bermanfaat bagi penulis.
2. Dra. Nunung Harijati, M.S, Rodliyati Azrianingsih, SSi, MSi, Dr. Dra. Sri Widyarti, M.Si, selaku dosen penguji atas saran membangun dalam penulisan tugas akhir ini.
3. Bapak Haryono dan Ibu Mardiyah selaku orang tua atas materi serta doa yang senantiasa diberikan kepada penulis, serta kakak (Tedi) dan adik (Yuli) tercinta atas semangat dan motivasi yang selalu diberikan kepada penulis.
4. Civitas akademika Jurusan Biologi, teman-teman seperjuangan (Nanik, Asih, Farih), temen-temen di laboratorium FKM, angkatan 2004 (vira, ima, tria), teman-teman kost orentz serta pihak-pihak yang tidak tersebut, yang senantiasa memberikan semangat dan bantuan kepada penulis.

Penulis menyadari bahwa dalam penulisan Tugas Akhir ini masih terdapat kekurangan. Kritik dan saran yang bersifat membangun sangat penulis harapkan untuk kesempurnaan penulisan selanjutnya. Semoga hasil penulisan ini dapat bermanfaat bagi pihak-pihak yang membutuhkan.

Malang, 23 Desember 2008

Penulis

## DAFTAR ISI

|                                                                                     | Halaman |
|-------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| <b>HALAMAN JUDUL</b> .....                                                          | i       |
| <b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....                                                     | ii      |
| <b>LEMBAR PERNYATAAN</b> .....                                                      | iii     |
| <b>ABSTRAK</b> .....                                                                | iv      |
| <b>ABSTRACT</b> .....                                                               | v       |
| <b>KATA PENGANTAR</b> .....                                                         | vi      |
| <b>DAFTAR ISI</b> .....                                                             | vii     |
| <b>DAFTAR GAMBAR</b> .....                                                          | ix      |
| <b>DAFTAR TABEL</b> .....                                                           | xi      |
| <b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....                                                        | xii     |
| <b>DAFTAR ISTILAH</b> .....                                                         | xiii    |
| <b>BAB I PENDAHULUAN</b>                                                            |         |
| 1.1. Latar Belakang.....                                                            | 1       |
| 1.2. Rumusan Masalah.....                                                           | 3       |
| 1.3. Tujuan Penelitian.....                                                         | 3       |
| 1.4. Manfaat Penelitian.....                                                        | 3       |
| <b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b>                                                      |         |
| 2.1. Teh ( <i>Camelia sinensis</i> L. O.Kuntze).....                                | 4       |
| 2.2. Produksi Metabolit Sekunder Melalui Kultur Jaringan Tanaman dan Elisitasi..... | 5       |
| 2.3. Struktur dan Biosintesis Kuersetin pada Tumbuhan.....                          | 7       |
| 2.4. Isolasi dan Identifikasi Flavonoid.....                                        | 11      |
| <b>BAB III METODE PENELITIAN</b>                                                    |         |
| 3.1. Waktu dan Tempat.....                                                          | 13      |
| 3.2. Rancangan Penelitian.....                                                      | 13      |
| 3.3. Pembuatan Media.....                                                           | 13      |
| 3.4. Induksi dan Pemeliharaan Kalus.....                                            | 14      |
| 3.5. Perlakuan Kalus Teh dengan $Mn^{2+}$ .....                                     | 14      |
| 3.6. Pertumbuhan Kalus Teh.....                                                     | 14      |
| 3.7. Ekstraksi Flavonoid dan Kuersetin dari Kalus Teh.....                          | 15      |
| 3.8. Analisis Senyawa Flavonoid dan Kuersetin Teh.....                              | 15      |
| 3.9. Analisis Data.....                                                             | 17      |

## **BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN**

- 4.1. Pengaruh Penambahan  $Mn^{2+}$  pada Media Terhadap  
Pertumbuhan Kalus Teh..... 18
- 4.2. Pengaruh  $Mn^{2+}$  dan Lama Kultur Terhadap  
Kandungan Flavonoid dan Kuersetin pada Kalus Teh.. 23
- 4.3. Hubungan Antara Berat Kering Kalus dengan  
Kandungan Flavonoid, Berat Kering Kalus dengan  
Kandungan Kuersetin dan Kandungan Flavonoid dan  
Kandungan Kuersetin Kalus Teh..... 29

## **BAB V PENUTUP**

- 5.1. Kesimpulan..... 32
- 5.2. Saran..... 32

## **DAFTAR PUSTAKA..... 33**





## DAFTAR GAMBAR

|                                                                                                                                                                                                             | Halaman |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| Gambar 2.1. Skema signal transduksi elisitornyang mengarah pada biosintesis $\beta$ -thujaplisin pada kultur sel <i>Cupresus lusitanica</i> .....                                                           | 7       |
| Gambar 2.2. Struktur dasar flavonoid.....                                                                                                                                                                   | 8       |
| Gambar 2.3. Jalur biosintesis metabolit sekunder.....                                                                                                                                                       | 9       |
| Gambar 2.4. Struktur kuersetin.....                                                                                                                                                                         | 10      |
| Gambar 2.5. Biosintesis kuersetin.....                                                                                                                                                                      | 10      |
| Gambar 4.1. Pertumbuhan kalus dari eksplan dari yang dikultur pada mediainduksi selama 2 minggu.....                                                                                                        | 18      |
| Gambar 4.2. Pertumbuhan kalus selama 8 minggu pada media induksi (kontrol) dan pada beberapa media perlakuan $Mn^{2+}$ .....                                                                                | 19      |
| Gambar 4.3. Kurva pertumbuhan kalus teh umur 0 – 8 minggu pada media kontrol dan perlakuan $Mn^{2+}$ .....                                                                                                  | 20      |
| Gambar 4.4. Pengaruh penambahan $Mn^{2+}$ pada media terhadap berat basah dan berat kering kalus teh pada lama kultur 4 dan 8 minggu.....                                                                   | 21      |
| Gambar 4.6. Hasil kromatografi lapis tipis ekstrak kalus teh pada media kontrol dan berbagai media perlakuan $Mn^{2+}$ .....                                                                                | 24      |
| Gambar 4.5. Pengaruh penambahan $Mn^{2+}$ pada media terhadap kandungan flavonoid dan kuersetin kalus teh pada lama kultur 4 dan 8 minggu.....                                                              | 26      |
| Gambar 4.7. Hubungan antara berat kering dengan kandungan flavonoid, berat kering dengan kandungan kuersetin dan kandungan flavonoid dan kandungan kuersetin kalus teh pada lama kultur 4 dan 8 minggu..... | 29      |
| Gambar 5.1. Hasil KLT standar kuersetin .....                                                                                                                                                               | 43      |
| Gambar 5.2. Kurva standar kuersetin.....                                                                                                                                                                    | 44      |
| Gambar 5.3. Analisis KLT kandungan kuersetin ekstrak kalus teh perlakuan 0 $Mn^{2+}$ dengan lama elisitasi 4 minggu.....                                                                                    | 45      |
| Gambar 5.4. Analisis KLT kandungan kuersetin ekstra kalus teh perlakuan 1 mg/L $Mn^{2+}$ pada lama kultur                                                                                                   |         |

|                                                                                                                                     |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4 minggu.....                                                                                                                       | 45 |
| Gambar 5.5. Analisis KLT kandungan kuersetin ekstrak kalus<br>teh perlakuan 5 mg/L $Mn^{2+}$ pada lama kultur                       |    |
| 4 minggu.....                                                                                                                       | 46 |
| Gambar 5.6. Analisis KLT kandungan kuersetin ekstrak kalus<br>teh perlakuan 10 mg/L $Mn^{2+}$ pada lama kultur                      |    |
| 4 minggu.....                                                                                                                       | 46 |
| Gambar 5.7. Analisis KLT kandungan kuersetin ekstrak kalus<br>teh perlakuan 0 mg/L $Mn^{2+}$ pada lama kultur                       |    |
| 8 minggu.....                                                                                                                       | 47 |
| Gambar 5.8. Analisis KLT kandungan kuersetin ekstrak kalus<br>teh perlakuan 1 mg/L $Mn^{2+}$ pada lama kultur                       |    |
| 8 minggu.....                                                                                                                       | 47 |
| Gambar 5.9. Analisis KLT kandungan kuersetin ekstrak kalus<br>teh perlakuan 5 mg/L $Mn^{2+}$ pada lama kultur                       |    |
| 8 minggu.....                                                                                                                       | 48 |
| Gambar 5.10. Analisis KLT kandungan kuersetin ekstrak<br>kalus teh perlakuan 10 mg/L $Mn^{2+}$ pada lama<br>elisitasi 8 minggu..... | 48 |

## DAFTAR TABEL

|                                                                                                                                                 | Halaman |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| Tabel 5.1. Komposisi larutan stok media MS + 2,4 D dan kinetin.....                                                                             | 39      |
| Tabel 5.2. Pengambilan larutan stok $Mn^{2+}$ .....                                                                                             | 40      |
| Tabel 5.3. Rata-rata berat basah kalus selama 8 minggu.....                                                                                     | 40      |
| Tabel 5.4. Rata-rata berat basah dan berat kering kalus pada media dengan berbagai konsentrasi $Mn^{2+}$ dengan lama kultur 4 dan 8 Minggu..... | 41      |
| Tabel 5.5. Rata-rata kandungan flavonoid kalus pada media dengan berbagai konsentrasi $Mn^{2+}$ dengan lama kultur 4 dan 8 minggu.....          | 41      |
| Tabel 5.6. Rata-rata kandungan kuersetin kalus teh pada masing-masing perlakuan.....                                                            | 42      |
| Tabel 5.7. Nilai luas area standar kuersetin.....                                                                                               | 44      |
| Tabel 5.8. Analisis ragam pengaruh $Mn^{2+}$ pada pertumbuhan kalus teh.....                                                                    | 49      |
| Tabel 5.9. Analisis ragam pengaruh $Mn^{2+}$ dan lama kultur pada berat basah kalus teh.....                                                    | 49      |
| Tabel 5.10. Analisis ragam pengaruh $Mn^{2+}$ dan lama kultur pada berat kering kalus teh.....                                                  | 49      |
| Tabel 5.11. Analisis ragam pengaruh $Mn^{2+}$ dan lama kultur pada kandungan flavonoid kalus teh.....                                           | 50      |
| Tabel 5.12. Analisis ragam pengaruh $Mn^{2+}$ dan lama kultur pada kandungan kuersetin kalus teh.....                                           | 50      |

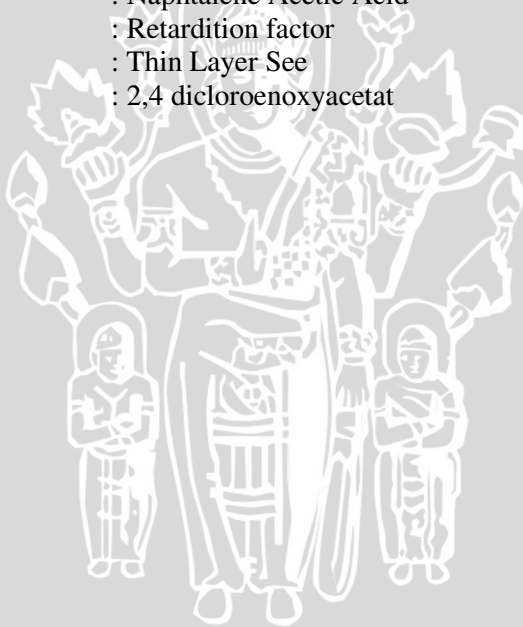
## DAFTAR LAMPIRAN

|                                                                                        | Halaman |
|----------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| Lampiran 1. Komposisi Larutan Stok Media MS dan Pembuatan Larutan Stok $Mn^{2+}$ ..... | 39      |
| Lampiran 2. Pertumbuhan Kalus Teh.....                                                 | 40      |
| Lampiran 3. Kandungan Flavonoid Kalus Teh.....                                         | 41      |
| Lampiran 4. Kandungan Kuerseti Kalus Teh.....                                          | 42      |
| Lampiran 5. Analisis KLT Kandungan Kuersetin Ekstrak Kalus Teh.....                    | 45      |
| Lampiran 6. Analisis Statistik.....                                                    | 49      |



## DAFTAR SINGKATAN

|                  |                            |
|------------------|----------------------------|
| BAP              | : Benzyl Amino Purine      |
| db               | : derajat bebas            |
| DNA              | : Deoxyribonucleic Acid    |
| HCL              | : Hidrogen chloride        |
| JK               | : Jumlah Kuadrat           |
| KLT              | : Kromatografi Lapis Tipis |
| KT               | : Kuadrat Tengah           |
| LAF              | : Laminar Air Flow         |
| Mn <sup>2+</sup> | : Mangan                   |
| MS               | : Murashige and Skoog      |
| NAA              | : Naphtalene Acetic Acid   |
| Rf               | : Retardition factor       |
| TLSee            | : Thin Layer See           |
| 2,4-D            | : 2,4 dicloroenoxyacetat   |





UNIVERSITAS BRAWIJAYA



# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Tanaman melakukan dua metabolisme penting yaitu metabolisme primer dan metabolisme sekunder. Pada metabolisme primer tanaman dihasilkan lipid, protein, dan karbohidrat. Sedangkan dari metabolisme sekunder dapat dihasilkan senyawa-senyawa metabolit sekunder seperti alkaloid, flavonoid dan lain sebagainya. Metabolit sekunder tanaman kebanyakan diproduksi sebagai bentuk dari mekanisme pertahanan pada tanaman itu sendiri, seperti karena adanya serangan patogen, serangan maupun karena stres lingkungan. Menurut Bratt (2000) produksi metabolit sekunder pada tanaman dapat dipengaruhi oleh adanya predator, patogen, dan adaptasi terhadap stres lingkungan.

Beberapa contoh senyawa metabolit sekunder tanaman yaitu flavonoid dan kuersetin. Kuersetin merupakan salah satu anggota flavonoid dari golongan flavonol yang memiliki banyak manfaat bagi kehidupan manusia salah satunya sebagai antikanker. Menurut Bors dkk (2000) kuersetin memiliki sifat sebagai antioksidan dengan kekuatan 100 kali lebih tinggi daripada vitamin C dan 25 kali vitamin E yang juga merupakan antioksidan potensial. Senyawa kuersetin banyak terkandung di dalam tanaman, salah satunya adalah tanaman teh. Menurut Scalbert dan Gary (2000) kadar kuersetin dalam daun teh berkisar 10-25 mg/L.

Senyawa-senyawa metabolit sekunder tanaman khususnya kuersetin dapat diproduksi baik secara *in vivo* (konvensional) maupun secara *in vitro* (melalui metode kultur jaringan tanaman). Fitriani (2003) menyatakan bahwa untuk mendapatkan senyawa metabolit sekunder, penggunaan teknik kultur jaringan tanaman lebih menguntungkan dibandingkan dengan metode konvensional. Hal ini disebabkan karena teknik kultur jaringan memberikan fasilitas yang lebih antara lain: produksi metabolit sekunder tidak tergantung pada iklim dan letak geografis, kondisi kultivasi dapat diatur sesuai dengan keinginan, membutuhkan waktu yang lebih singkat dan tidak membutuhkan lahan yang luas. Selain itu bahan sel yang dikultur bebas dari kontaminasi mikroba, sehingga dapat dipastikan biosintesis yang terjadi hanya dimediasi oleh jaringan tanaman tanpa adanya asosiasi dengan mikroba.

Produksi metabolit sekunder melalui teknik kultur jaringan tanaman dapat dilakukan melalui kultur suspensi, kultur rambut akar maupun kultur kalus. Beberapa penelitian menyebutkan bahwa penggunaan metode kultur jaringan tanaman dapat meningkatkan kandungan metabolit sekunder pada tanaman. Beberapa diantaranya yaitu produksi ajmalisin pada *Catharanthus roseus* melalui kultur suspensi dapat ditingkatkan sebanyak 0,7 %, kandungan ginsenoside pada *Panax ginseng* melalui kultur suspensi dapat meningkat sebanyak 22,5% dan kandungan Anthraquinones pada *Morinda citrifolia* melalui kultur suspensi dapat meningkat sebanyak 15% dibandingkan dengan pada tanaman utuh (Misawa, 1994). Kultur rambut akar dan kultur suspensi tidak cocok diaplikasikan pada tanaman teh karena berdasarkan studi pendahuluan kalus teh memiliki tekstur yang keras dan memiliki sifat yang kurang responsif terhadap infeksi *Agrobacterium rhizogense*. Oleh karenanya pada penelitian ini digunakan teknik kultur jaringan dengan menggunakan kultur kalus. Menurut Anonimus (2008) kultur kalus memiliki beberapa kelebihan diantaranya kultur kalus lebih stabil, proliferasi sel cepat, dan mudah diperbanyak. Pertumbuhan kalus pada beberapa jenis tanaman mulai mengalami penurunan setelah 4 minggu kultur sehingga perlu dilakukan subkultur setiap 4 minggu. Kultur kalus tanaman kina menunjukkan bahwa pada lama kultur 8 minggu kalus telah mencapai fase stasioner Sumaryono dan Riyadi (2005), kultur *Catharanthus roseus* dan *Pueraria candollei* yang menunjukkan penurunan pertumbuhan setelah 28 dan 24 hari (Fitriani, (2003), Thanonkeo dan Sanha (2006)).

Produksi metabolit sekunder dapat lebih ditingkatkan dengan metode elisitasi dalam kultur jaringan. Beberapa penelitian telah membuktikan bahwa penggunaan metode elisitasi dapat meningkatkan produksi metabolit sekunder pada tanaman, diantaranya kapsaicin pada kultur sel *Capsicum frutescens* dapat ditingkatkan sebanyak 4,4% dengan penambahan  $\text{Ca}^{2+}$  (Sudha dan Ravishankar, 2002) dan peningkatan kandungan gosipol pada kultur akar kapas (*Gossypium hirsutum*) dengan elisitor jamur *Yerticillium dahliae* sebesar 62,81% (Setiawati, 2001). Elisitasi merupakan proses pemberian elisitor pada sel tumbuhan dengan tujuan untuk menginduksi dan meningkatkan pembentukan metabolit sekunder (Logermann dkk, 1995). Elisitor tersebut dapat berupa jamur, bakteri, garam, maupun logam berat diantaranya ion logam  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ , dan

$Mn^{2+}$  yang merupakan nutrisi esensial yang diperlukan untuk metabolisme dan juga merupakan elisitor logam yang dapat memicu produksi fitoaleksin dalam jumlah yang besar (Silva dan William, 1993). Pada penelitian ini digunakan ion logam  $Mn^{2+}$  karena merujuk pada penelitian yang dilakukan oleh Sukmaningrum (2006) yang mana  $Mn^{2+}$  yang ditambahkan sebesar 1 kali MS dapat menginduksi kandungan daidzein pada kultur bengkuang. Salah satu faktor yang mempengaruhi akumulasi senyawa metabolit sekunder pada tanaman adalah lama kultur. Fitriani (2003) menuturkan bahwa kalus *Catharanthus roseus* yang menunjukkan saat pertumbuhan kalus mulai melambat (akhir fase eksponensial atau awal fase stasioner) terjadi sintesis ajmalisin yang cukup tinggi. Oleh karenanya pada penelitian ini digunakan ion logam  $Mn^{2+}$  sebagai elisitor dengan lama kultur 4 dan 8 minggu yang diharapkan mampu meningkatkan kandungan kuersetin pada kalus teh.

## **1.2 Rumusan Masalah**

Berdasarkan latar belakang diatas, masalah pada penelitian ini adalah bagaimana pengaruh penambahan  $Mn^{2+}$  pada media kultur terhadap pertumbuhan kalus selama 8 minggu serta kandungan flavonoid dan kuersetin kalus teh pada 4 dan 8 minggu.

## **1.3 Tujuan**

Tujuan dari penelitian ini yaitu mengetahui pengaruh penambahan  $Mn^{2+}$  pada media kultur terhadap pertumbuhan kalus selama 8 minggu serta kandungan flavonoid dan kuersetin kalus teh pada 4 dan 8 minggu.

## **1.4 Manfaat**

Hasil penelitian ini diharapkan dapat meningkatkan kandungan kuersetin pada tanaman teh melalui teknik kultur jaringan dengan penambahan logam  $Mn^{2+}$  sehingga nantinya produksi senyawa tersebut dapat digunakan dalam bidang kesehatan khususnya dalam mengatasi kanker.



## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

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

Teh yang biasa dikonsumsi oleh masyarakat berasal dari dedaunan muda dan pucuk daun tanaman teh (*Camellia sinensis*). Dua varietas utama yang populer adalah teh berdaun kecil asal Cina, *Camellia sinensis sinensis*, dan teh berdaun lebar asal Assam, India, *C. sinensis assamica* (Yan, 2008)

Jenis tanaman, umur tanaman, jenis petikan, ketinggian kebun dan klon sangat mempengaruhi kandungan kimia teh. Karena kondisi tanah dan iklim lingkungannya, hampir 100% tanaman teh di Indonesia adalah *Camellia sinensis* varietas *assamica*. Varietas ini mempunyai kandungan polifenol yang lebih tinggi dibandingkan dengan varietas *assamica* yang dibudidayakan di Jepang, China dan Taiwan sehingga potensinya sebagai antioksidan lebih baik (Rodiana dan Tantan, 2004)

Teh hijau mengandung lebih dari 36% polifenol. Kunci utama dari khasiat teh berada pada komponen bioaktifnya, yaitu polifenol yang secara optimal terkandung dalam daun teh yang muda dan utuh. Menurut Pusat Penelitian Teh dan Kina (PPTK) (2007) jenis polifenol pada teh yang telah teridentifikasi pada tingkat kandungan rata-rata diantaranya katekin : 63 – 210 mg%, flafanol : 14 – 21 mg%, tearubigin : 0 – 28 mg%, polifenol lainnya 266 – 273 mg%.

Teh sebagian besar mengandung ikatan biokimia yang disebut polifenol, termasuk subkelas di dalamnya flavonoid. 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. Subkelas dari polifenol meliputi *flavones*, *flavonols*, *flavanones*, *catechins*, *antocyanidin*, dan *isoflavones*. Turunan *flavonols*, *quercetin* dan turunan *catechins*, *epi-catechin* (EC), *epigallo-catechin* (EGC), *epigallo-catechin gallate* (EGCg) umumnya ditemukan di dalam teh (Bors, 2000).

Beberapa hasil studi menunjukkan bahwa dengan mengkonsumsi teh dapat menurunkan risiko penyakit kanker. Senyawa polifenol dalam teh mampu memberikan perlindungan terhadap zat karsinogenik. Epigallo-catechin gallate (EGCg) yang terdapat dalam teh hijau merupakan senyawa aktif yang berperan mencegah



terjadinya kanker. Studi epidemiologis di Jepang menunjukkan bahwa tingkat kematian akibat kanker pada penduduk yang mendiami daerah produsen utama teh hijau amat sedikit. Hasil studi tersebut menyimpulkan bahwa mengkonsumsi sekurangnya 2 cangkir teh hitam sehari akan mengurangi resiko terkena kanker kandung kemih sebanyak 40%, dan 68% pada penyakit kanker saluran pencernaan bila dibandingkan dengan yang tidak mengkonsumsi teh. Terdapat beberapa teori yang berkembang bahwa teh memiliki kemampuan sebagai pencegah penyakit kanker, diantaranya senyawa antioksidan dalam teh mencegah terjadinya kerusakan DNA oleh radikal bebas, polifenol mencegah terjadinya pertumbuhan sel yang tidak terkendali sehingga mampu memperlambat perkembangan kanker dan polifenol tertentu kemungkinan dapat menghancurkan sel-sel kanker dengan tanpa merusak sel-sel sehat di sekitarnya (Pusat Penelitian Teh dan Kina, 2007).

## **2.2 Produksi Metabolit Sekunder Melalui Kultur Jaringan Tanaman dan Elisitasi**

Tanaman memproduksi berbagai macam metabolit sekunder yang mana salah satu fungsinya adalah untuk pertahanan hidup di dalam ekosistem. Produksi metabolit sekunder pada tanaman dapat dipengaruhi oleh beberapa hal yaitu diantaranya adanya predator, patogen, adaptasi terhadap stress lingkungan dan beberapa hal berhubungan dengan kepentingan untuk reproduksinya. Misalnya mekanisme pertahanan tanaman dalam menghadapi herbivora, beberapa tanaman akan memproduksi beberapa variasi metabolit sekunder diantaranya senyawa toksik atau senyawa yang mirip dengan substansi yang juga diproduksi oleh hewan seperti *growth hormones* atau feromon. Selain itu dalam menghadapi stress lingkungan tanaman juga akan memproduksi beberapa senyawa metabolit sekunder dan enzim-enzim yang dapat menangkal radikal bebas antara lain peroksidase dan katalase (Bratt dkk, 2000).

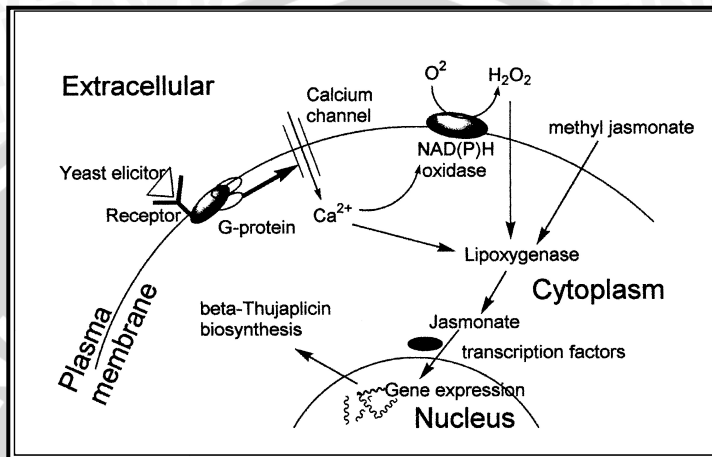
Metabolit sekunder diketahui menunjukkan berbagai manfaat biologis yang meliputi antibakteri, antikanker, dan antioksidan yang bermanfaat dalam bidang pertanian, industri makanan, dan industri pengobatan. Metabolit sekunder, secara umum terdapat 1-3% dalam berat kering tanaman, disintesis di dalam sel tanaman yang sedang

berkembang dan memiliki struktur yang kompleks yang membuatnya sulit untuk diekstraksi dan dipurifikasi. Kandungan metabolit sekunder dapat ditingkatkan melalui teknik kultur jaringan. Teknik ini cukup efisien digunakan untuk produksi dalam skala besar (Wink, 1999).

Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa penggunaan teknik elisitasi dalam kultur jaringan dapat meningkatkan kandungan metabolit sekunder pada tanaman. Diantaranya kandungan flavonoid pada *Glycyrrhiza uralensis* Fisch dengan elisitor *Agrobacterium rhizogenes* dapat meningkat sebanyak 14,4% dan kandungan asam rosmarinic pada *L. erythrorhizon* dapat meningkat sebanyak 2,5 kali dengan elisitor *yeast* (Kovalenko dan Maliuta, 2002). Elisitasi merupakan proses penambahan elisitor pada sel tumbuhan dengan tujuan untuk menginduksi dan meningkatkan pembentukan metabolit sekunder. Elisitor terdiri atas dua kelompok, yaitu elisitor abiotik dan elisitor biotik (Logermann dkk, 1995). Elisitor abiotik dapat berasal dari senyawa anorganik, radiasi secara fisik seperti ultraviolet, logam berat dan deterjen (Robins, 1994). Elisitasi adalah suatu metode yang mengacu pada fenomena alam dalam mekanisme pertahanan inang terhadap patogennya. Prinsip kerja metode ini yaitu interaksi patogen dengan inang akan menginduksi pembentukan fitoaleksin pada tumbuhan. Fitoaleksin itu sendiri merupakan senyawa antibiotik yang mempunyai berat molekul rendah, dan dibentuk pada tumbuhan tinggi sebagai respons terhadap infeksi mikroba patogen. Senyawa yang merupakan bagian dari mekanisme tersebut dapat dianalogikan dengan antibodi yang terbentuk sebagai respon imun pada hewan. Elisitor selain dapat menginduksi sintesis fitoaleksin, ternyata dapat juga menginduksi sintesis metabolit sekunder selain fitoaleksin pada kultur kalus dan sel (Logermann dkk, 1995).

Adanya elisitor akan mengaktifkan reseptor G-protein (receptor-coupled G-protein) yang kemudian akan mengaktifkan protein *canel* sehingga  $\text{Ca}^{2+}$  dapat masuk ke dalam sel. Masuknya ion  $\text{Ca}^{2+}$  akan menginisiasi beberapa *signaling pathway*, seperti calmodulin, biosintesis jasmonat yang dapat berfungsi sebagai senyawa pertahanan pada tanaman serta biosintesis thujaplicin. Ion  $\text{Ca}^{2+}$  bertindak sebagai *second messenger* yang dapat meregulasi lipoxigenase yang merupakan enzim kunci untuk biosintesis asam jasmonat. Selanjutnya asam jasmonat tersebut akan menuju ke nukleus dan akan mengaktifkan beberapa gen sehingga dapat

terbentuk beberapa senyawa metabolit sekunder, contohnya thujaplicin (Gambar 2.1) (Zao dan Sakai, 2002)



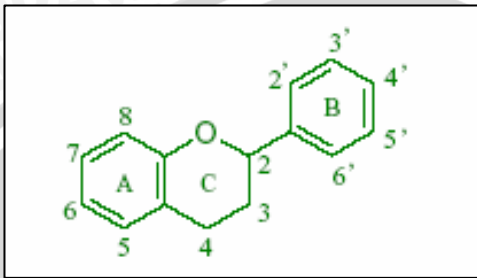
Gambar 2.1 Skema signal transduksi elicitor yang mengarah pada biosintesis  $\beta$ -thujaplicin pada kultur sel *Cupressus lusitanica* (Zao dan Sakai, 2002)

### 2.3 Struktur dan Biosintesis Kuersetin pada Tumbuhan

Senyawa flavonoid merupakan senyawa fenol yang terbanyak ditemukan di alam diantaranya pada buah, sayur, begitu juga dengan teh dan anggur. Senyawa-senyawa ini merupakan zat warna ungu, merah, biru serta kuning yang ditemukan dalam tumbuhan. Flavonoid terdiri dari berbagai macam jenis, beberapa diantaranya flavon, flavonol dan antosianodin yang merupakan flavonoid yang banyak ditemukan didalam tanaman (Lenny, 2006). Flavonoid biasanya dicirikan oleh adanya karbon skeleton  $\text{C}_6\text{-C}_3\text{-C}_6$  dan terdiri dari tiga struktur cincin yaitu A, B, C (Gambar 2.2). Cincin A dan B dihubungkan oleh tiga unit karbon dan diikat oleh oksigen yang mengandung *heterocycle* (cincin C) (Jedinak dkk, 2004).

Biosintesis metabolisme sekunder dapat dilakukan melalui tiga jalur yaitu jalur asam sikimat, mevalonat dan jalur asetat dengan masing-masing precursor yaitu asam sikimat, asam mevalonat dan asetil koenzim A (Gambar 2.3). Senyawa kunci untuk ke tiga jalur tersebut adalah senyawa hasil glikolisis atau intermediatnya. Dari senyawa-senyawa tersebut dapat terbentuk beberapa terpenoid,

alkaloid, flavonoid melalui siklus kreb atau melalui jalur sikimat (Tolonen, 2003).

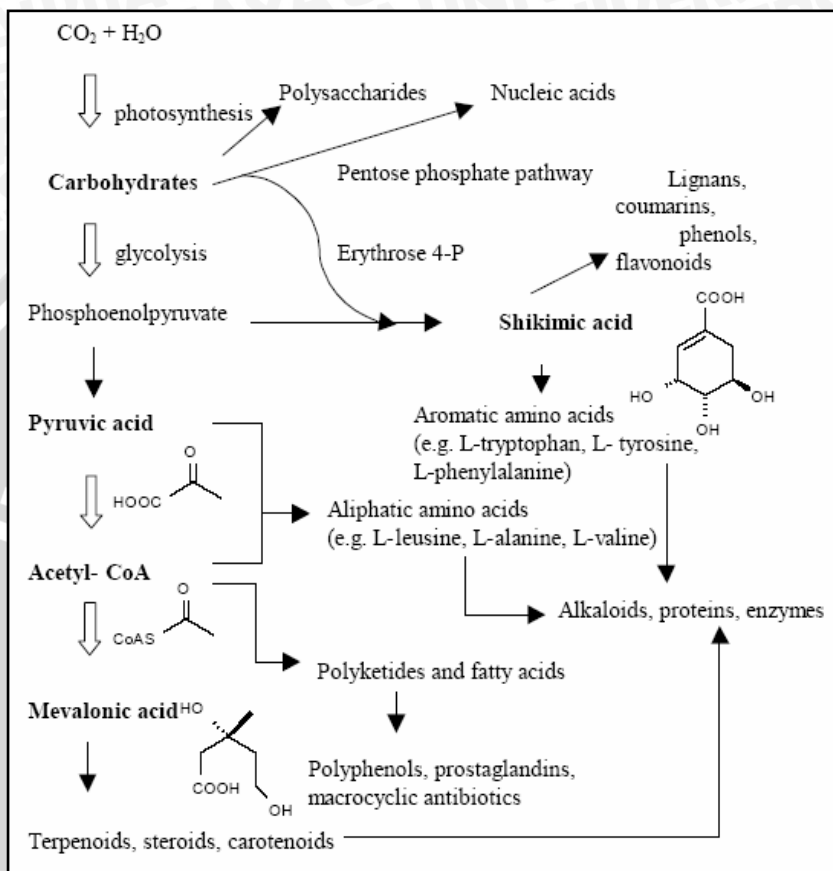


Gambar 2.2. Stuktur Dasar Flavonoid (Jedinak dkk., 2004)

Flavonoid terbentuk dari kombinasi produk hasil biosintesis jalur sikimat dan asetat, dimana tiga unit *malonyl CoA* ditambahkan pada intermediat jalur sikimat seperti *cinnamoyl-CoA* untuk membentuk *polyketide*. *Polyketide* selanjutnya akan terlipat (*folded*) untuk membentuk struktur *chalcone* dan selanjutnya akan dirubah menjadi flavonoid (Tolonen, 2003).

Kuersetin merupakan senyawa flavonoid dari kelompok flavonol yang terdapat terutama dalam teh, tomat, apel, kakao, anggur dan bawang. Kuersetin terbagi atas kuersetin-3-glukosida (isokuersetin), kuersetin-3-rhamnosida (kuerstitrin), dan kuersetin-3-rutinoside (rutin). Kandungan kuersetin dalam teh diketahui tidak hanya dapat menurunkan resiko kematian akibat penyakit jantung koroner tetapi juga akibat penyakit kanker, karena oleh sejumlah ahli kesehatan kuersetin dipertimbangkan sebagai fitoestrogen yang memiliki fungsi yang sama dengan estrogen yang diyakini memiliki efek antiestrogenik untuk mengurangi risiko kanker (Sibuea, 2004). Hal ini didukung oleh struktur kuersetin yang memiliki tiga ciri pada strukturnya, yaitu 3, 4 hidroksi pada cincin B, 2,3-ikatan rangkap pada cincin C dan sebuah gugus 3-hidroksil pada cincin C dan gugus 5, 7 hidroksil pada cincin A (Gambar 2.4). Struktur tersebut membuat kuersetin memiliki aktivitas antioksidan yang sangat kuat (Bors, 2000).

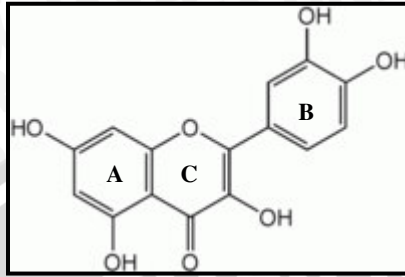




Gambar 2.3 Jalur Biosintesis Metabolit Sekunder (Tolonen, 2003)

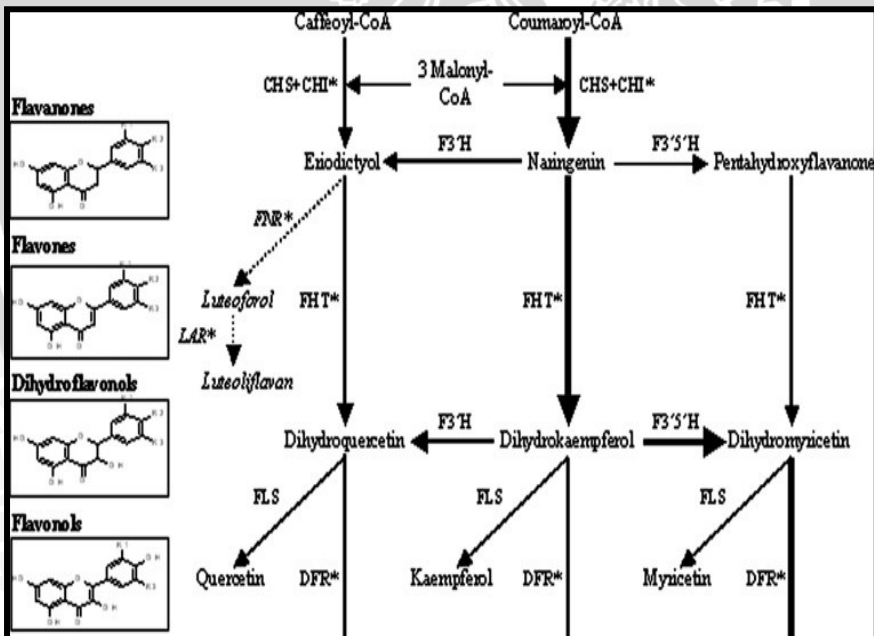
Produksi metabolit sekunder pada tanaman berbeda-beda tergantung pada spesies dan tempat produksinya, dan biasanya dihasilkan oleh sel-sel tertentu dan tidak digunakan oleh sel tersebut namun untuk keseluruhan tanaman. Pada teh kuersetin termasuk dalam golongan polifenol yang paling banyak disintesis pada daun, khususnya daun yang masih muda (Forrest dan Bendall, 1969). Menurut Scalbert dan Gary (2000) kadar kuersetin pada teh berkisar 10-25 mg/L, sedangkan menurut Woude (2006) kadarnya berkisar 13-24 mg/L (teh hijau) dan 10-25 % (teh hitam).





Gambar 2.4 Struktur kuersetin (Crystal dkk, 2003)

Salah satu alternatif biosintesis kuersetin pada tumbuhan yaitu melalui Caffeyol-CoA yang akan diubah menjadi *Eriodictyol* oleh enzim CHS (*Chalcone synthase*) dan CHI (*Chalcone isomerase*). Selanjutnya eriodictyol akan diubah menjadi *dihydroquercetin* oleh enzim FHT (*Flavone syntase*) dan kemudian akan menjadi kuersetin dengan bantuan enzim FLS (*Flavonol synthase*) (Punyasiri dkk, 2004) (Gambar 2.5).



Gambar 2.5 Biosintesis kuersetin ( Punyasiri dkk, 2004)

## 2.4 Isolasi dan Identifikasi Flavonoid

Ragam ekstraksi yang tepat tergantung pada tekstur dan kandungan air bahan tumbuhan yang akan diekstrak serta pada jenis senyawa yang diisolasi. Flavonoid terutama berupa senyawa yang mudah larut dalam air sehingga dapat diekstraksi menggunakan metanol, etanol, aseton ataupun eter (Harborne, 1987)

Pemisahan dan pemurnian kandungan metabolit tumbuhan terutama dilakukan melalui teknik kromatografi. Kromatografi Lapis Tipis (KLT) merupakan cara analisis cepat yang memerlukan bahan sangat sedikit, baik penyerap maupun cuplikannya. Kromatografi lapis tipis dapat digunakan untuk memisahkan senyawa – senyawa yang sifatnya hidrofobik seperti lipida – lipida dan hidrokarbon yang sulit dikerjakan dengan kromatografi kertas. Kromatografi lapis tipis juga dapat digunakan untuk isolasi senyawa murni pada skala kecil. Pelarut yang dipilih untuk pengelusi disesuaikan dengan sifat kelarutan senyawa yang dianalisis. Bahan lapisan tipis seperti silika gel adalah senyawa yang tidak bereaksi dengan pereaksi – pereaksi yang lebih reaktif seperti asam sulfat. Data yang diperoleh dari KLT adalah nilai  $R_f$  yang berguna untuk identifikasi senyawa. Nilai  $R_f$  untuk senyawa – senyawa murni dapat dibandingkan dengan nilai  $R_f$  dari senyawa standar. Nilai  $R_f$  menggambarkan besarnya hambatan suatu senyawa terhadap larutan elusinya. Semakin senyawa tersebut bersifat polar maka akan semakin besar hambatannya oleh larutan elusinya yang bersifat non polar sehingga senyawa tersebut akan berada dibawah dan begitu juga sebaliknya. Nilai  $R_f$  dapat didefinisikan sebagai jarak yang ditempuh oleh senyawa dari titik asal dibagi dengan jarak yang ditempuh oleh pelarut dari titik asal. Oleh karena itu bilangan  $R_f$  selalu lebih kecil dari 1,0 (Syahirah, 2008).

Pelaksanaan kromatografi lapis tipis menggunakan sebuah lapis tipis silika atau alumina yang seragam pada sebuah lempeng gelas atau logam atau plastik yang keras. Fase diam untuk kromatografi lapis tipis seringkali juga mengandung substansi yang bisa menghasilkan pendaran flour ketika diberi sinar ultra violet. Jel silika (atau alumina) merupakan fase diam. Permukaan jel silika sangat polar dan karenanya gugus -OH dapat membentuk ikatan hidrogen dengan senyawa-senyawa yang sesuai disekitarnya. Ketika pelarut mulai membasahi lempengan, pelarut pertama akan melarutkan senyawa-senyawa dalam bercak yang telah ditempatkan pada garis

dasar. Senyawa-senyawa akan cenderung bergerak pada lempengan kromatografi sebagaimana halnya pergerakan pelarut (Poole, 2007).

Spektrofotometri merupakan suatu metode pengukuran kuantitatif dari refleksi atau komponen transmisi suatu materi pada panjang gelombang tertentu. Spektrofotometer terdiri dari dua instrument, yaitu spektrometer untuk menghasilkan cahaya dari beberapa warna yang diseleksi (panjang gelombang), dan fotometer untuk mengukur intensitas cahaya. Instrumen-instrumen tersebut kemudian disusun sehingga cairan dalam kuvet dapat ditempatkan diantara spectrometer dan fotometer. Banyaknya cahaya yang melewati tabung diukur oleh fotometer. Fotometer akan mengirimkan signal pada galvanometer yang kemudian signal tersebut akan dibaca sebagai banyaknya atau jumlah cahaya yang diserap (Bioscience, 2008).



## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dimulai pada bulan Oktober 2007 dan berakhir pada Desember 2008, bertempat di Laboratorium Fisiologi, Kultur Jaringan dan Mikroteknik Tumbuhan, Jurusan Biologi, dan Laboratorium Kimia Organik, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya Malang.

#### **3.2 Rancangan Penelitian**

Rancangan penelitian yang digunakan pada penelitian ini yaitu Rancangan Acak Lengkap faktorial. Dua faktor yang digunakan meliputi variasi konsentrasi  $Mn^{2+}$  yaitu 0, 1, 5 dan 10 mg/L dan lama kultur yaitu 4 dan 8 minggu. Setiap perlakuan dilakukan 10 kali ulangan. Parameter pertumbuhan yang meliputi morfologi serta berat basah dan berat kering kalus yang diamati setiap 2 minggu sekali selama 8 minggu. Analisis kandungan flavonoid dan kuersetin dilakukan pada kalus yang telah dielisisasi selama 4 dan 8 minggu.

#### **3.3 Pembuatan Media**

Media yang digunakan untuk induksi kalus adalah media dasar MS yang ditambahkan dengan hormon Kinetin dan 2,4-D. Media tersebut dibuat dengan mencampur larutan stok (lampiran 1) ke dalam erlemeyer dan ditambahkan hormon kinetin dan 2,4-D masing-masing sebanyak 1 mg/L. Larutan stok kemudian ditambah 30 g gula, dilarutkan bersama aquades, diukur pH hingga 5,8 dan ditambah agar sebanyak 11 g kemudian dipanaskan hingga mendidih. Selanjutnya larutan dituang kedalam botol kultur, ditutup rapat dengan aluminium foil kemudian disterilisasi di dalam autoklaf pada 121°C, tekanan 2 atm selama 9 menit. Media kemudian didinginkan hingga memadat. Media elisitasi dibuat dengan menambahkan  $Mn^{2+}$  pada media induksi sebanyak 1, 5 dan 10 mg/L untuk masing-masing perlakuan (1, 5 dan 10  $Mn^{2+}$ ).

### 3.4 Induksi dan Pemeliharaan Kalus

Kalus diinduksi dari eksplan daun teh (*Camellia sinensis* var *assamica*) yang diambil dari kebun teh Singosari Lawang yang telah siap panen (daun pucuk telah membuka sempurna). Dua daun pucuk kemudian dicuci dengan air mengalir selama  $\pm 15$  menit dan dimasukkan ke dalam larutan fungisida (0,5%) dan didiamkan selama  $\pm 1$  jam. Selanjutnya daun dimasukkan dalam LAF (*Laminar Air Flow*) dan digojoy dalam larutan sterilan (NaClO 1,05 %) selama 20 menit kemudian dibilas dengan aquades sebanyak 3 kali, dimana masing-masing penggojokan dilakukan selama 5 menit. Daun yang telah steril diambil dengan pinset dan diletakkan diatas cawan Petri. Bagian pinggir daun dipotong dan ibu tulang daun dihilangkan. Selanjutnya daun dipotong dengan ukuran  $\pm 1\text{cm} \times 1\text{cm}$ , kemudian ditanam dalam media induksi. Kultur selanjutnya diinkubasi pada ruang yang bersuhu  $\pm 25^{\circ}\text{C}$  dan disinari lampu neon 35,39 watt/m<sup>2</sup> selama 24 jam sampai tumbuh kalus.

Pemeliharaan kalus dilakukan dengan cara memotong-motong kalus teh menjadi bagian yang lebih kecil  $\pm 0,5\text{cm}^2$  kemudian dipindah kedalam media induksi baru. Kalus diinkubasi kembali pada ruang yang bersuhu  $\pm 25^{\circ}\text{C}$  dan disinari lampu neon 35,39 watt/m<sup>2</sup> selama 24 jam, tekanan udara 758 mmHg dan kelembaban sebesar 62%.

### 3.5 Perlakuan Kalus Teh dengan Mn<sup>2+</sup>

Kalus yang telah berumur 1 bulan dipotong dan ditimbang seberat 0,04 g dan ditanam pada masing-masing media perlakuan (media dengan penambahan Mn<sup>2+</sup> pada media induksi masing-masing sebesar 1, 5 dan 10 mg/L), dan pada media kontrol (media induksi). Potongan kalus dimasukkan sebanyak 4 buah pada masing-masing botol kultur. Kalus diletakkan pada ruang bersuhu  $\pm 25^{\circ}\text{C}$  dan disinari lampu neon 35,39 watt/m<sup>2</sup> selama 24 jam perhari dengan lama perlakuan 4 dan 8 minggu.

### 3.6 Pertumbuhan Kalus Teh

Kalus yang telah berumur 1 bulan dipotong, ditimbang seberat 0,04 g dan ditanam pada masing-masing media perlakuan dan pada media induksi sebagai kontrol. Potongan kalus dimasukkan sebanyak 4 buah pada masing-masing botol kultur. Kalus diletakkan pada



ruang bersuhu  $\pm 25^{\circ}\text{C}$  dan disinari lampu neon  $35,39 \text{ watt/m}^2$  selama 24 jam sehari dengan lama kultur 8 minggu

Laju pertumbuhan kalus teh dilakukan dengan menimbang berat basah 4 kalus teh dalam satu botol pada tiap-tiap perlakuan setiap 2 minggu sekali selama 8 minggu. Kalus ditimbang satu-persatu selanjutnya kalus dimasukkan kembali ke dalam botol. Penimbangan kalus dilakukan didalam LAF untuk mencegah terjadinya kontaminasi. Hasilnya, kemudian dicatat dan dirata-rata. Selain menimbang berat basah kalus juga dilakukan pengamatan warna kalus. Pada umur 4 dan 8 minggu dilakukan pengukuran berat basah dan berat kering. Pengeringan kalus dilakukan dengan memasukkan kalus ke dalam oven selama 3 hari pada suhu  $60^{\circ}\text{C}$  sampai mencapai berat konstan.

### **3.7 Ekstraksi Flavonoid dan Kuersetin dari Kalus dan Daun Teh**

Ekstraksi flavonoid dan kuersetin pada kalus teh mengacu pada metode yang telah dilakukan oleh Yuliani dkk (2003). Ekstraksi flavonoid dan kuersetin dilakukan dengan menimbang kalus kering atau daun teh kering yang telah digerus dalam mortar sampai halus masing-masing sebanyak 0,25 g. Kalus dan daun yang telah ditimbang dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 5 ml aseton p.a dan 0,5 ml larutan HCl 25%. Sampel dipanaskan di dalam *waterbath* pada suhu  $70^{\circ}\text{C}$  selama 3 menit. Ekstrak kemudian disaring menggunakan kertas saring dan filtrat yang diperoleh dimasukkan kedalam labu ukur 25 ml. Pencucian ampas dengan aseton diulangi sampai diperoleh filtrat sebanyak 25 ml.

Filtrat yang diperoleh dipipet sebanyak 5 ml, kemudian ditambah 3,75 ml etil asetat p.a lalu dikocok menggunakan vortek dan didiamkan selama 15 menit sampai terbentuk 2 lapisan. Lapisan bawah (fase aseton-air) dipisahkan dari lapisan atas (fase etil asetat). fase etil asetat selanjutnya ditambahkan 10 ml akuades dan digojog menggunakan *shaker* selama 5 menit (180 rpm) yang diulangi sebanyak 3 kali. Lapisan atas diambil dan ditampung dalam tabung polipropilen.

### **3.8 Analisis Senyawa Flavonoid dan Kuersetin Kalus Teh**

Analisis kuantitatif senyawa flavonoid dalam teh dilakukan menggunakan spektrofotometer. Hasil ekstrak ditampung dalam

tabung polipropilen (13 ml) dan ditambahkan etil asetat sampai tanda batas 12,5 ml. Larutan bagian atas diambil sebanyak 2,5 ml kedalam gelas ukur 10 ml, kemudian ditambahkan dengan 0,125 ml larutan Na-sitrat 0,5% dalam air dan 0,5 ml campuran larutan (2 g  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ditambah dengan 100 ml larutan asam asetat 5% dalam methanol p.a). Kedalam gelas ukur 10 ml ditambahkan larutan asam aetat 5% dalam methanol p.a sampai tanda batas 6,25 ml dan dibiarkan selama 25 menit. Larutan selanjutnya diukur absorbansinya pada 425 nm dengan menggunakan larutan blanko (0,125 ml larutan Na-sitrat 5% dalam air dan ditambahkan dengan larutan asam asetat 5% dalam methanol p.a sampai tanda batas pada gelas ukur 6,25 ml). Kandungan flavonoid dihitung dengan rumus:

$$\% \text{ Flavonoid} = A \times 0,735/g$$

Keterangan:

A = absorbansi sampel

g =  $(100 - \text{KA})\% \times W$

KA = susut pengeringan (%b/b)

$$= \left( \frac{W_{60^\circ} - W_{110^\circ}}{W_{60^\circ}} \times 100\% \right)$$

W = berat sampel sesuai dengan penimbangan g

Analisis senyawa kuersetin pada kalus teh secara kualitatif mengacu pada metode yang telah dilakukan oleh Yuliani dkk (2003) dan telah dimodifikasi. Analisis kualitatif senyawa kuersetin teh dilakukan dengan menggunakan teknik KLT yang dilakukan dengan cara menotolkan ekstrak kalus kontrol dan kalus yang telah dielisisasi  $\text{Mn}^{2+}$  (1, 5, 10 mg/L yang masing-masing berumur 4, dan 8 minggu), kontrol, ekstrak dari daun teh, dan senyawa kuersetin sintetik (Kuersetin Sigma) pada kertas Kiesegel 60 F<sub>254</sub> (20 x 10 cm) menggunakan pipa kapiler pada jarak 1 cm dari bawah dan 1 cm dari masing-masing titik antar perlakuan. Masing-masing sampel ditotolkan sebanyak 20  $\mu\text{l}$ . Standar yang digunakan sebanyak 4 dengan masing-masing totalan yaitu 5, 10, 15 dan 20 pipa (10  $\mu\text{l}$ , 20  $\mu\text{l}$ , 30  $\mu\text{l}$  dan 40  $\mu\text{l}$ ) dan daun sebanyak 20  $\mu\text{l}$ . Hasil totalan selanjutnya dielusi pada bejana pengembang sejauh 8 cm dengan menggunakan larutan eluen (toluen : dietil eter : asam asetat = 10:10:2). Hasilnya dilihat dibawah sinar UV dengan panjang

gelombang 254 dan 366 nm yang kemudian akan tampak spot sirkular maupun memanjang dan hasilnya difoto. Analisis kuantitatif dilakukan dengan menghitung luas area spot yang tampak pada plat yang kemudian dianalisis menggunakan program TLSee. Dari hasil analisis tersebut akan diperoleh gambar berupa kurva (Lampiran 6.3) dan luas area yang kemudian dimasukkan pada persamaan kurva standar (Lampiran 5) sehingga diketahui kandungan kuersetin pada plat. Kandungan kuersetin pada plat dikonversi kembali untuk memperoleh kandungan kuersetin pada sampel dengan rumus sebagai berikut (Rahmawati, 2006):

$$KQ: \frac{\frac{V_{\text{ekstrak}}}{V_{\text{totalan}}} \times KW}{\text{Berat sampel}} \times \frac{100}{(100-KA)}$$

Keterangan:

KQ : konsentrasi kuersetin (ng/mg)

$V_{\text{ekstrak}}$  : volume ekstrak (ml)

$V_{\text{totalan}}$  : volume totalan (μl)

KW : konsentrasi kuersetin dalam plate (ng/20 μl)

KA : susut pengeringan (%b/b)

$$: \left( \frac{W_{60^{\circ}} - W_{110^{\circ}}}{W_{60^{\circ}}} \times 100\% \right)$$

### 3.9 Analisis Data

Data yang dikumpulkan meliputi berat basah dan berat kering kalus serta kandungan flavonoid dan kuersetin. Data yang diperoleh diolah dan diuji dengan ANOVA. Apabila terdapat beda, maka akan dilanjutkan dengan uji Duncan untuk mengetahui apakah terdapat beda nyata dari masing-masing perlakuan. Data dianalisis dengan program SPSS *for windows release 12*.

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 4.1 Pengaruh Penambahan $Mn^{2+}$ pada Media MS Terhadap Pertumbuhan Kalus Teh

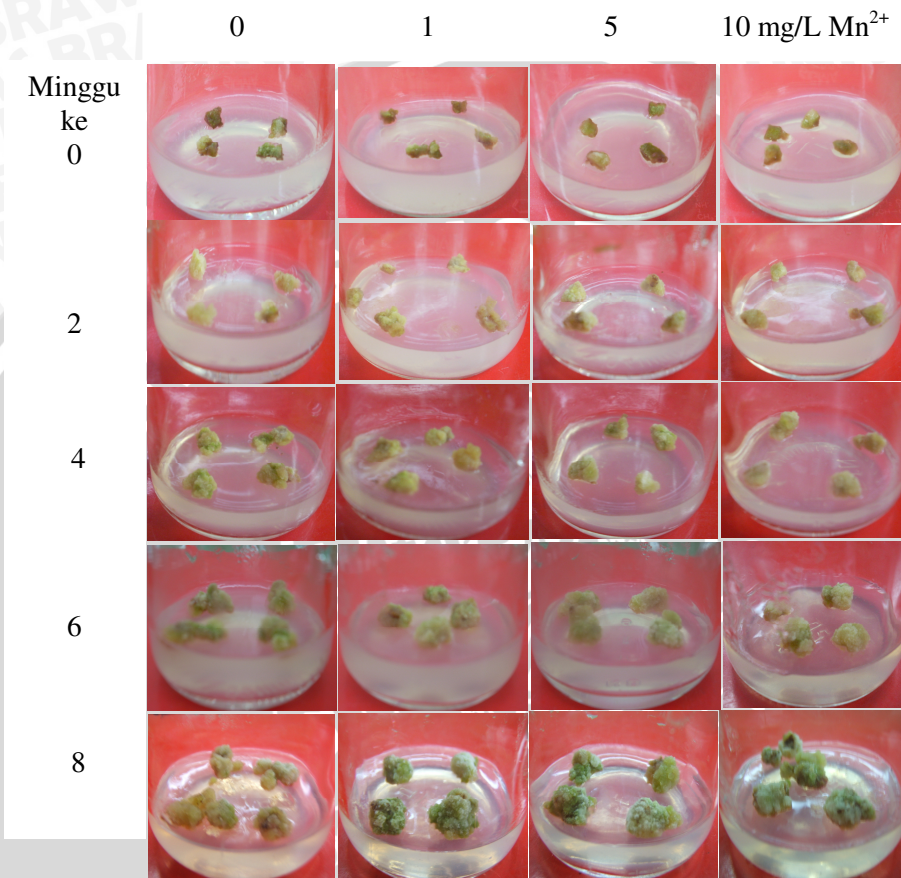
Eksplan daun teh yang dikultur pada media dasar MS dengan penambahan hormon 2,4 D dan kinetin masing-masing 1 ml/L, mulai membentuk kalus pada umur 4-6 minggu setelah induksi. Berdasarkan uji pendahuluan kalus yang ditanam pada media dengan hormon 2,4 D dan kinetin masing-masing 1 mg/L menunjukkan pertumbuhan yang lebih cepat dan lebih baik dibandingkan dengan daun teh yang dikultur pada media dasar MS + 2,4 D 0,5 mg/L + BAP 1 mg/L atau media dasar MS + NAA 1 mg/L + kinetin 1 mg/L. Kalus mulai terbentuk pada bagian tepi eksplan daun (Gambar 1) berwarna kuning kehijauan dan bertekstur padat (kompak).



Gambar 4.1 Pertumbuhan kalus dari eksplan dari yang dikultur pada media induksi selama 2 minggu

Pada tahapan penelitian berikutnya digunakan media dasar MS + 2,4 D dan kinetin 1 mg/L untuk memperoleh materi kalus yang lebih banyak dan cukup untuk perlakuan berikutnya maka kalus disubkultur 2 kali masing-masing telah berumur 4 minggu. Kalus yang terbentuk pada media kontrol (media induksi) maupun pada media perlakuan (media induksi +  $Mn^{2+}$  1, 5, 10 mg/L) berwarna kekuningan pada awal inkubasi sampai dengan minggu ke-4. Namun pada minggu ke-6 dan minggu ke-8 kalus mulai tampak berubah warna yaitu menjadi hijau kekuningan dan terdapat sebagian kecil kalus yang berwarna coklat (Gambar 4.2).





Gambar 4.2 Pertumbuhan kalus selama 8 minggu pada media induksi (kontrol) dan pada beberapa media perlakuan  $Mn^{2+}$

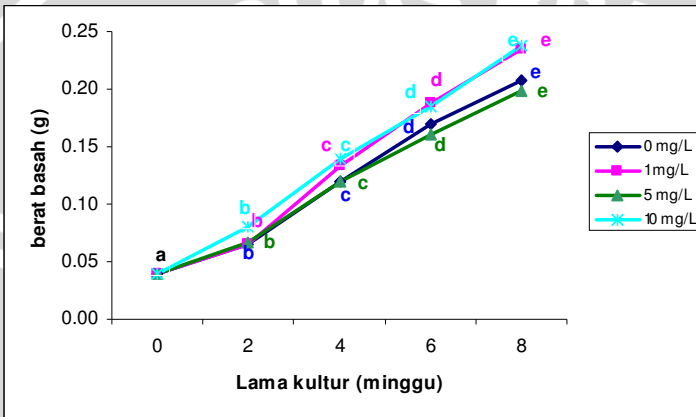
Menurut Kristina dkk (2007), komponen pertumbuhan kalus meliputi diameter dan berat basah kalus. Oleh karena itu untuk melihat pertumbuhan kalus pada penelitian ini salah satunya diamati melalui berat basah kalus.

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa pertumbuhan kalus dipengaruhi oleh lama kultur, sedangkan penambahan  $Mn^{2+}$  tidak mempengaruhi pertumbuhan kalus (Lampiran 6). Secara umum pertumbuhan kalus pada semua perlakuan  $Mn^{2+}$  maupun kontrol mulai menunjukkan adanya peningkatan yang signifikan pada 2



minggu kultur. Pertumbuhan kalus menunjukkan adanya peningkatan seiring dengan bertambahnya lama kultur (Gambar 4.3).

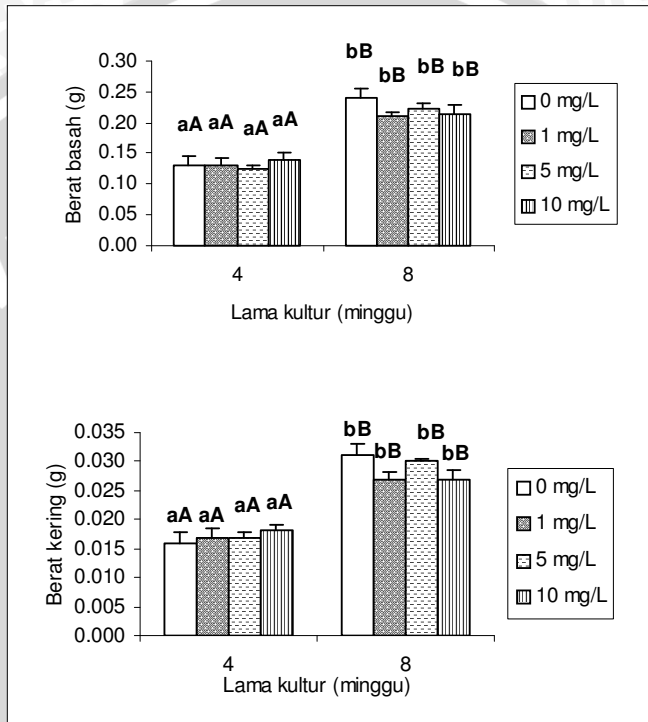
Kalus pada media kontrol dan perlakuan pada 8 minggu kultur masih mengalami pertumbuhan yang dapat terlihat pada kurva pertumbuhan kalus yang masih dalam posisi puncak (Gambar 4.3). Hasil tersebut menunjukkan bahwa lama kultur 8 minggu, pertumbuhan kalus masih dalam fase eksponensial dan belum mencapai fase stasioner.



Gambar 4.3 Kurva pertumbuhan kalus teh umur 0 – 8 minggu pada media kontrol dan perlakuan  $Mn^{2+}$ . Keterangan: huruf kecil yang sama pada konsentrasi elisitor yang sama menunjukkan beda nyata berdasarkan uji *Duncan* pada tingkat signifikansi 0,05%

Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan  $Mn^{2+}$  pada media tidak berpengaruh terhadap berat basah dan berat kering kalus. Akan tetapi berat basah dan berat kering kalus lebih dipengaruhi oleh lama kultur (4 dan 8 minggu) ( $\alpha=0,05$ ). Berat basah atau berat kering kalus kontrol dan perlakuan dengan lama kultur 4 dan 8 minggu relatif sama. Pada umur 4 minggu berat basah kalus kontrol sebesar 0,132 g, dan pada kalus perlakuan berkisar 0,126- 0,141g. Sedangkan berat kering kalus pada kalus kontrol sebesar 0,016 g, dan pada kalus perlakuan berkisar 0,017-0,018 g. Pada umur 8 minggu berat basah kalus kontrol menjadi 0,240 dan pada kalus perlakuan berkisar 0,210-0,224 g. Sedangkan berat kering kalus kontrol sebesar 0,0331 g dan pada kalus perlakuan berkisar 0,027-0,030 g (Gambar

4.4). Berat basah dan berat kering kalus baik pada media kontrol maupun pada media dengan penambahan  $Mn^{2+}$  selama 8 minggu lebih besar dibandingkan dengan 4 minggu.



Gambar 4.4 Pengaruh penambahan  $Mn^{2+}$  pada media terhadap berat basah dan berat kering kalus teh pada lama kultur 4 dan 8 minggu. Keterangan: huruf kecil yang sama pada lama kultur yang sama tidak menunjukkan adanya beda nyata berdasarkan uji *Duncan* pada tingkat signifikansi 0,05. Huruf kapital pada perlakuan konsentrasi elisitor yang sama menunjukkan beda nyata berdasarkan uji *Duncan* pada tingkat signifikansi 0,05 (Bar=SE, n=10).

Pertumbuhan eksplan yang dikultur dapat dipengaruhi oleh beberapa hal diantaranya jenis eksplan, rasio dan jenis hormon yang diberikan. Pemberian rasio hormon auksin dan sitokinin yang seimbang akan menginduksi eksplan membentuk kalus. Menurut

Gamborg (2002) zat pengatur tumbuh yang dibutuhkan oleh sebagian sel yang dikultur adalah auksin dan sitokinin. Auksin berperan dalam menstimulasi pemanjangan sel dan sitokinin dapat memacu pembelahan sel. Pemberian auksin dan sitokinin yang seimbang dapat memicu pembentukan kalus. Rahayu (2005) melaporkan bahwa penggunaan media dasar MS + 2,4 D dan Kinetin masing-masing 3 mg/L dapat menumbuhkan kalus teh dengan baik.

Kalus teh yang terbentuk bertekstur kompak atau keras karena kemungkinan kalus mengalami lignifikasi (Anonimus, 2008). Perubahan warna kalus dari kekuningan pada awal induksi menjadi coklat pada beberapa kalus diakhir kultur 8 minggu kemungkinan disebabkan nutrisi yang diperoleh dari medium digunakan untuk pembelahan sel terlebih dahulu, namun setelah 8 minggu kemungkinan kalus mengalami gradient nutrisi sehingga hal tersebut memicu kalus untuk mensintesis senyawa metabolit sekunder. Warna coklat pada kalus menandakan adanya sintesis senyawa fenol. Menurut fitriani (2003), warna coklat pada kalus menunjukkan adanya sintesis senyawa fenolik, yang mana sintesis tersebut dipacu oleh adanya cekaman atau gangguan pada sel tanaman. Menurut George dan Sherrington (1995) secara umum kalus melakukan mekanisme pertahanan terhadap cekaman, salah satunya dengan pembentukan senyawa fenol yang biasanya diikuti dengan perubahan warna kalus menjadi coklat. Menurut Anonimus (2008) kalus yang tumbuh pada media padat nantinya akan mengalami gradient difusi terhadap nutrisi di dalam media yang akan menyebabkan pertumbuhan dan metabolismenya mengalami perubahan. Selain itu kalus akan mensekresi sisa-sisa metabolisme ke dalam media yang dapat meracuni pertumbuhan kalus itu sendiri. Chlaimont, dkk (1985) melaporkan bahwa penambahan ion logam  $Mn^{2+}$  pada kultur kalus tembakau menyebabkan adanya gangguan pada sintesis klorofil.

Media merupakan salah satu faktor yang dapat mempengaruhi pertumbuhan atau berat basah kalus. Adanya pemberian elisitor yang tidak memberikan pengaruh terhadap berat basah dan berat kering kalus, kemungkinan disebabkan karena  $Mn^{2+}$  merupakan mikronutrien yang dibutuhkan oleh tanaman. Konsentrasi  $Mn^{2+}$  yang diberikan kemungkinan masih terlalu rendah sehingga kalus mampu beradaptasi terhadap logam  $Mn^{2+}$ . Oleh karenanya hal ini tidak mempengaruhi pertumbuhan kalus dan menyebabkan hasilnya tidak

berbeda nyata dengan perlakuan kontrol. Aklimasi merupakan peningkatan kemampuan kultur dalam menghadapi cekaman lingkungan yang diberikan secara terus menerus. Peningkatan ini kemungkinan disebabkan perubahan ekspresi gen pada kultur (Taiz dan Zeiger, 2002). Baligar dan Duncan (1990) menyebutkan bahwa tanaman akan berkembang secara normal apabila hara atau nutrisi yang tersedia sesuai dengan kebutuhan tanaman tersebut, namun apabila tanaman tidak dapat menerima hara yang cukup seperti yang dibutuhkan, maka pertumbuhannya akan lemah. Pertumbuhan yang abnormal juga akan terjadi jika tanaman menyerap hara yang melebihi untuk kebutuhan metabolismenya. Mangan merupakan elemen dimana pada pertumbuhan tanaman dapat menyebabkan toksik dan defisiensi tergantung pada konsentrasinya, faktor lingkungan, spesies tanaman dan tipe tanah (Johansson, 2005).

Kurva pertumbuhan kalus adalah 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).

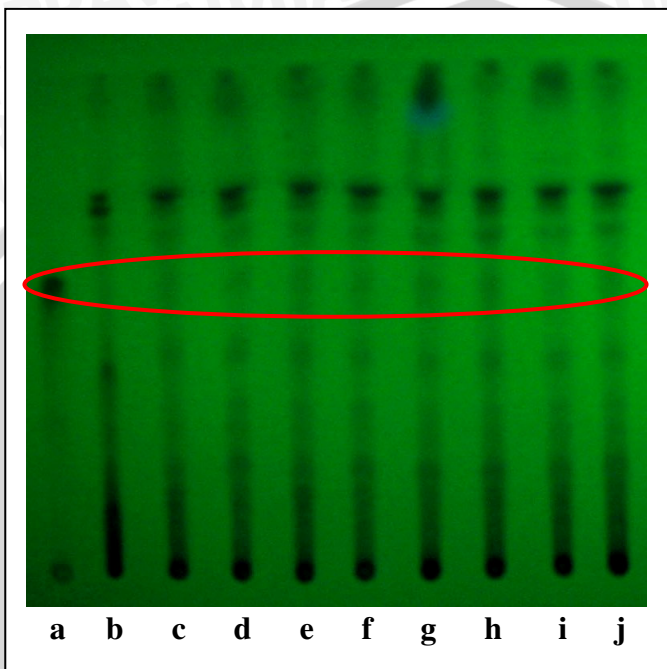
Peningkatan berat basah dan berat kering kalus lebih disebabkan oleh umur kultur. Hal ini terlihat pada kalus yang dikultur pada media kontrol tanpa penambahan elisitor. Berat basah maupun berat kering kalus pada umur 8 minggu kultur lebih besar dibandingkan berat basah dan berat kering kalus pada umur 4 minggu kultur.

#### **4.2 Pengaruh Penambahan $Mn^{2+}$ pada Media dan Lama Kultur Terhadap Kandungan Flavonoid dan Kuersetin pada Kalus Teh**

Pada penelitian ini setelah ditambahkan metanol hasil ekstrak kalus teh yang diperoleh berwarna kuning kecoklatan. Hasil elusi menunjukkan adanya senyawa-senyawa metabolit sekunder pada plat yang memisah, sehingga tampak berupa noda yang berbentuk spot maupun memanjang yang berwarna abu-abu atau gelap (Gambar



4.5). Senyawa kuersetin ditunjukkan dengan adanya spot yang letaknya sejajar dengan standar yang digunakan.



Gambar 4.5 Hasil kromatografi lapis tipis ekstrak kalus teh pada media kontrol dan berbagai media perlakuan yang meliputi: a. kuersetin murni, b. daun, c. kontrol, d. 1 mg/L  $Mn^{2+}$  e. 5 mg/L  $Mn^{2+}$ , f. 10 mg/L  $Mn^{2+}$  (4 minggu), g. kontrol, h. 1 mg/L  $Mn^{2+}$ , i. 5 mg/L  $Mn^{2+}$ , j. 10 mg/L  $Mn^{2+}$  (8 minggu). Keterangan: spot yang dilingkari menunjukkan spot kuersetin

Derajat letak noda pada KLT ditentukan berdasarkan nilai Rf. Nilai Rf dapat diketahui melalui perbandingan jarak yang ditempuh oleh komponen dengan jarak yang ditempuh oleh pelarut. Nilai Rf kuersetin pada penelitian ini berkisar antara 0,53-0,58.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kandungan flavonoid dan kuersetin pada daun teh lebih tinggi dibandingkan dengan kandungan flavonoid dan kuersetin pada kalus teh. Kandungan flavonoid dan kuersetin pada daun teh masing-masing sebesar 28,3  $\mu\text{g}/\text{mg}$  dan

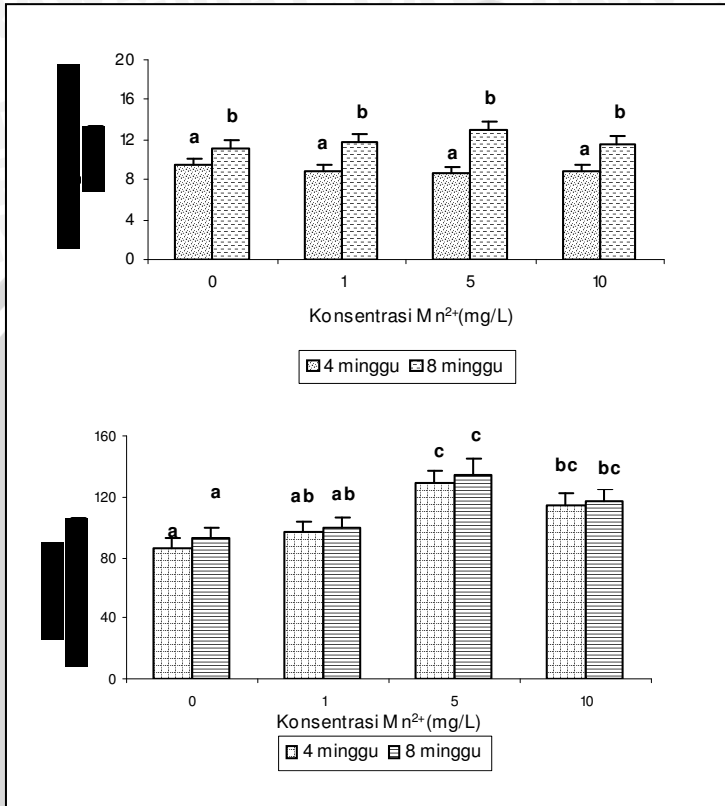


108,95 ng/mg, sedangkan kandungan flavonoid dan kuersetin pada kalus kontrol masing-masing sebesar 11, 15  $\mu\text{g/mg}$  dan 92,72 ng/mg.

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa pemberian  $\text{Mn}^{2+}$  berpengaruh terhadap kandungan kuersetin, namun tidak berpengaruh pada kandungan flavonoid. Sedangkan lama kultur lebih berpengaruh terhadap kandungan flavonoid namun tidak pada kandungan kuersetin kalus teh ( $\alpha=0,05$ ).

Kandungan flavonoid pada kalus perlakuan maupun kontrol pada lama kultur 4 minggu lebih rendah jika dibandingkan dengan kandungan flavonoid pada kalus perlakuan maupun kontrol Pada lama kultur 8 minggu (Gambar 4.6). Kandungan flavonoid pada kalus perlakuan ( $\text{Mn}^{2+}$  1, 5 dan 10 mg/L) pada lama kultur 4 minggu masing-masing sebesar 8,91; 8,63 dan 8,93  $\mu\text{g/mg}$ , sedangkan kandungan flavonoid kalus perlakuan pada lama kultur 8 minggu masing-masing sebesar 11,7; 12,96 dan 11,6  $\mu\text{g/mg}$ .

Penambahan  $\text{Mn}^{2+}$  pada media dapat mempengaruhi kandungan kuersetin kalus teh. Hal ini dapat diketahui bahwa dengan menambahkan  $\text{Mn}^{2+}$  antara 5-10 mg/L pada media pada lama kultur 4 dan 8 minggu dapat meningkatkan kandungan kuersetin pada kalus teh. Sedangkan kandungan kuersetin pada pemberian  $\text{Mn}^{2+}$  dengan konsentrasi 1 mg/L lebih besar dibandingkan dengan kontrol namun demikian hal ini tidak berbeda nyata secara signifikan. Kandungan kuersetin kalus pada lama kultur 8 minggu lebih tinggi jika dibandingkan dengan kandungan kuersetin kalus pada lama kultur 4 minggu walaupun tidak berbeda nyata. Kandungan kuersetin kalus kontrol umur 4 dan 8 minggu masing-masing sebesar 86,09 dan 92,72 ng/mg sedangkan pada kalus dengan perlakuan penambahan  $\text{Mn}^{2+}$  dengan lama kultur 4 dan 8 minggu masing-masing berkisar antara 96,69-128,48 ng/mg dan 99,34-135,10 ng/mg. Berdasarkan data kandungan flavonoid dan kuersetin dapat diketahui bahwa kandungan kuersetin kalus teh hanya berkisar antara 0,8-1% dari kandungan flavonoid.



Gambar 4.6 Pengaruh Penambahan  $Mn^{2+}$  pada media terhadap kandungan flavonoid an kuersetin kalus teh pada lama kultur 4 dan 8 minggu. Keterangan: huruf kecil yang sama pada konsentrasi elisitor yang sama pada grafik kandungan flavonoid menunjukkan adanya beda nyata, sedangkan huruf kecil yang sama pada lama kultur yang sama pada kandungan kuersetin menunjukkan adanya beda nyata berdasarkan uji *Duncan* dengan tingkat signifikansi 0,05 (Bar=SE, n=2).

Kandungan flavonoid dan kuersetin daun yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan kalus teh diduga karena pada kalus kemungkinan tidak semua enzim yang berperan untuk mensintesis

senyawa metabolit sekunder terdapat secara lengkap seperti pada tanaman utuh. Sehingga kemungkinan terdapat senyawa metabolit sekunder tertentu yang ada dalam daun teh namun tidak terdapat pada kalus dan hal inilah yang menyebabkan kandungan flavonoid kalus lebih rendah dibandingkan dengan daun. Wewetzer (1998) melaporkan bahwa metabolit sekunder berhubungan dengan proses diferensiasi sel sehingga dapat terjadi substansi yang ada pada tanaman utuh dapat tidak terdeteksi pada kalus. Seperti pada kultur *Digitalis lantana* yang tidak terdeteksi adanya kandungan glikosida pada jaringan yang belum mengalami diferensiasi. Lebih lanjut juga disebutkan bahwa pada umumnya jaringan yang belum mengalami diferensiasi jumlah metabolit sekundernya lebih sedikit jika dibandingkan dengan jaringan yang telah mengalami diferensiasi. Hal ini disebabkan karena tidak cukup enzim-enzim untuk sintesis dan akumulasi metabolit sekunder pada jaringan yang belum mengalami diferensiasi.

Pemberian  $Mn^{2+}$  yang tidak berpengaruh pada kandungan flavonoid diduga disebabkan karena rentang konsentrasi elisitor yang tidak terlalu signifikan antara perlakuan satu dengan yang lainnya. Sehingga hal ini tidak mempengaruhi produksi flavonoid pada kalus teh.

Kandungan flavonoid dan kuersetin kalus pada lama kultur 4 minggu lebih rendah dari pada 8 minggu, karena pada waktu 4 minggu kalus diduga lebih banyak melakukan metabolisme primer yang berperan penting dalam pertumbuhannya dan hanya sedikit melakukan metabolisme sekunder sehingga kandungan flavonoidnya masih sedikit. Sedangkan pada waktu 8 minggu kemungkinan kalus telah mencapai fase eksponensial akhir atau mendekati fase stasioner yang dapat diketahui dari sebagian kalus yang mengalami pencoklatan. Pada fase tersebut kalus mulai memproduksi senyawa metabolit sekunder secara intensif. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Scrag (1990) kandungan alkaloid pada kultur *Catharanthus roseus* meningkat sering dengan pertumbuhan sel, dan hal ini berlangsung terus walaupun kalus telah mengalami fase stasioner. Menurut Thanonkeo dan Sanha (2006) selama fase pertumbuhan akumulasi metabolit sekunder berjalan lambat, namun produksi metabolit sekunder akan berjalan intensif selama fase stasioner. Boungard dkk (2001) menjelaskan bahwa lambatnya produksi metabolit sekunder pada awal fase pertumbuhan berjalan

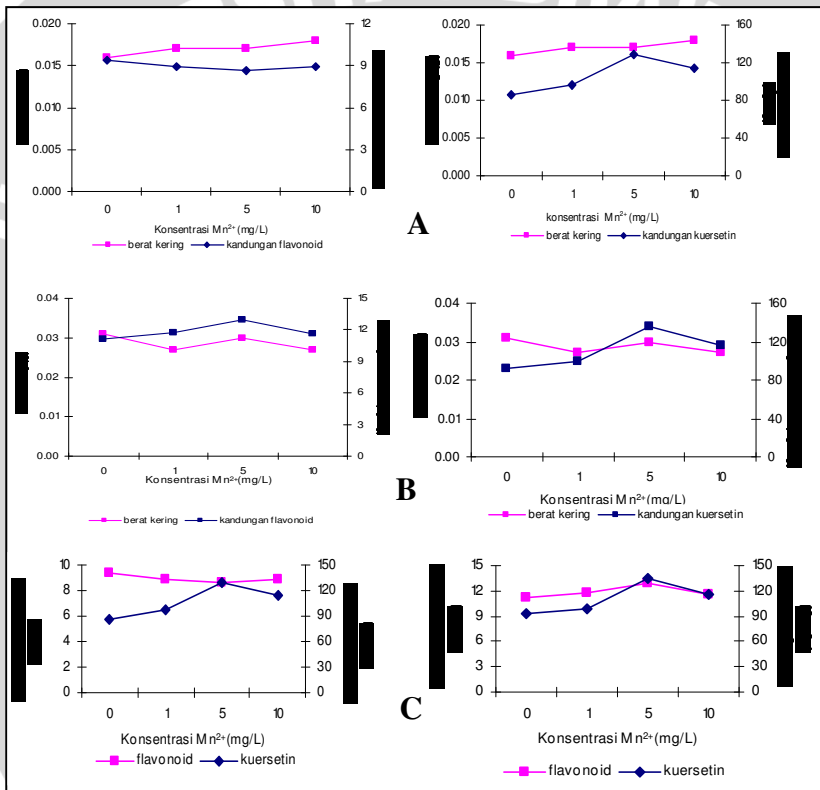
lambat, hal ini dikarenakan karbon yang terbentuk digunakan untuk kebutuhan pertumbuhan (membangun struktur sel dan respirasi), ketika pertumbuhan melambat, karbon tidak lagi dibutuhkan dalam jumlah besar untuk metabolisme primer sehingga karbon dapat digunakan untuk metabolisme sekunder.

Peningkatan kandungan flavonoid dan kuersetin kalus teh lebih disebabkan oleh umur kultur. Hal ini terlihat pada kalus yang dikultur pada media kontrol tanpa penambahan elisitor, kandungan flavonoid dan kuersetin kalus pada umur 8 minggu kultur lebih besar dibandingkan kandungan flavonoid dan kuersetin kalus pada umur 4 minggu kultur.

Konsentrasi 5 mg/L  $Mn^{2+}$  pada kalus umur 8 minggu merupakan konsentrasi optimum untuk meningkatkan kandungan kuersetin pada kalus teh. Karena pada konsentrasi tersebut pemberian  $Mn^{2+}$  mampu meningkatkan pembentukan senyawa kuersetin pada kalus teh. Hal ini dapat disebabkan karena fungsi  $Mn^{2+}$  merupakan kofaktor enzim yang dapat mengaktifkan enzim-enzim termasuk enzim yang berperan dalam sintesis senyawa metabolit sekunder sehingga kandungan kuersetin meningkat. Pada perlakuan 10 mg/L  $Mn^{2+}$  kandungan kuersetin mengalami penurunan karena kemungkinan senyawa kuersetin telah diubah menjadi bentuk senyawa metabolit sekunder lain yang juga berfungsi dalam pertahanan. Bratt (2000) menyatakan bahwa salah satu cara tanaman untuk mendetoksifikasi metal yaitu dengan mensintesis senyawa-senyawa fenolik seperti flavonoid, asam fenolik dan lainnya, ataupun dengan mensintesis senyawa-senyawa lain seperti enzim (peroksidase, katalase dan superoksida dismutase) dan lipid. Pemberian elisitor mampu meningkatkan pembentukan senyawa metabolit sekunder. Adanya elisitor menyebabkan bertambah pula ion kalsium yang mana akan berikatan dengan kalmodulin. Ikatan kalsium kalmodulin inilah yang akan mengaktifasi enzim-enzim yang mengkatalisis pembentukan metabolit sekunder (Namdeo, 2007). Salah satu enzim yang bertanggung jawab dalam mensintesis senyawa fenolik yaitu, PAL (*Phenylalanine ammonia lyase*) (Ali dkk, 2007).

### 4.3 Hubungan antara Berat Kering dengan Kandungan Flavonoid, Berat kering dengan Kandungan Kuersetin dan Kandungan Flavonoid dengan Kandungan Kuersetin Kalus Teh

Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat hubungan antara berat kering kalus dengan kandungan flavonoid dan kuersetin serta kandungan flavonoid dengan kandungan kuersetin kalus teh baik pada lama kultur 4 dan 8 minggu (Gambar 4.7)



Gambar 4.7 Hubungan antara berat kering kalus dengan kandungan Flavonoid, berat kering dengan kandungan kuersetin dan kandungan flavonoid dan kuersetin pada kalus teh  
Keterangan: A: BK-flavonoid-kuersetin 4 minggu, B: BK-flavonoid-kuersetin 8 minggu C: flavonoid-kuersetin 4 dan 8 minggu



Hubungan antara kandungan flavonoid dan kuersetin kalus pada lama kultur 8 minggu serta kandungan kuersetin kalus pada lama kultur 4 minggu berbanding lurus dengan berat keringnya. Hal ini dapat diketahui dari peningkatan berat kering kalus yang disertai dengan peningkatan kandungan flavonoid maupun kuersetinnya kecuali kandungan flavonoid dan kuersetin pada kalus kontrol umur 8 minggu.

Berbeda pada kandungan flavonoid kalus dengan lama kultur 4 minggu yang cenderung berbanding terbalik dengan berat kering kalus. Hal tersebut dapat diketahui dari adanya peningkatan berat kering kalus diiringi dengan penurunan kandungan flavonoidnya.

Korelasi antara kandungan flavonoid dan kuersetin dengan berat kering kalus dapat disebabkan karena penambahan  $Mn^{2+}$  dapat menunjang pertumbuhan kalus. Selain itu juga  $Mn^{2+}$  yang diberikan juga berperan sebagai kofaktor enzim sehingga kandungan flavonoid dan kuersetinnya juga meningkat. Pada penelitian yang dilakukan oleh Scragg (1990) menunjukkan hasil bahwa pada fase eksponensial kandungan alkaloid pada kultur *C. roseus* berbanding lurus dengan berat keringnya, dan berbanding terbalik setelah kalus mencapai fase stasioner. Hubungan yang berbanding terbalik antara berat kering kalus dengan kandungan flavonoidnya dapat disebabkan karena saat pertumbuhan kalus lebih memanfaatkan nutrisi untuk melakukan metabolisme primer yang hasilnya digunakan untuk menunjang pertumbuhan kalus dan hanya sedikit melakukan metabolisme sekunder, sehingga hal inilah yang menyebabkan kandungan flavonoid pada kalus perlakuan lebih rendah jika dibandingkan dengan kontrol. Lindsey dan Yeoman (1983) menuturkan bahwa dalam kultur terjadi persaingan dalam memperoleh nutrisi yang digunakan untuk sintesis metabolit sekunder dan primer. Saat terjadi pertumbuhan kalus yang cepat, maka nutrisi digunakan untuk melakukan metabolisme primer, sehingga akumulasi metabolit sekunder relatif rendah. Sebaliknya saat pertumbuhan kalus lambat, maka nutrisi digunakan untuk melakukan metabolisme sekunder sehingga akumulasi metabolit sekunder tinggi.

Pada lama kultur 4 minggu kandungan flavonoid berbanding terbalik dengan kandungan kuersetin kalus. Hal ini diketahui dari adanya penurunan kandungan flavonoid diikuti dengan peningkatan kandungan kuersetinnya. Sedangkan pada lama kultur 8 minggu kandungan flavonoid berbanding lurus dengan kandungan kuersetin,

dimana peningkatan maupun penurunan kandungan favonoid juga diikuti dengan peningkatan maupun penurunan kandungan kuersetinnya (Gambar 4.7).

Hubungan berbanding terbalik antara kandungan flavonoid dan kandungan kuersetin diduga karena  $Mn^{2+}$  yang ditambahkan pada media dapat meningkatkan sintesis kuersetin dengan mengaktifkan enzim-enzim yang berperan untuk sintesis kuersetin, namun menghambat sintesis senyawa-senyawa golongan flavonoid lain sehingga kandungan flavonoidnya rendah. Sedangkan hubungan yang berbanding lurus antara kandungan flavonoid dengan kandungan kuersetin diduga karena  $Mn^{2+}$  yang ditambahkan pada media selain dapat meningkatkan sintesis senyawa-senyawa flavonoid yang termasuk juga didalamnya adalah senyawa kuersetin. Beberapa enzim yang terlibat dalam sintesis flavonoid antara lain *Chalcone Flavonone Isomerase* (CFI), *Antocyanidin Synthase* (ANS), *Chalcone Synthase* (CHS) (Oulu University Library, 2003). Sedangkan enzim yang terlibat dalam biosintesis kuersetin diantaranya CHI (*Chalcone isomerase*), FHT (*Flavone syntase*), dan FLS (*Flavonol synthase*) (Punyasiri dkk, 2004)

## **BAB V PENUTUP**

### **5.1 Kesimpulan**

Pertumbuhan kalus teh tidak dipengaruhi oleh penambahan  $Mn^{2+}$  pada media, namun lebih dipengaruhi oleh lama kultur. Berat basah dan berat kering kalus terus meningkat sampai dengan 8 minggu.

Daun memiliki kandungan flavonoid dan kuersetin yang lebih tinggi dibandingkan dengan kalus teh. Penambahan  $Mn^{2+}$  tidak berpengaruh pada kandungan flavonoid, tetapi berpengaruh pada kandungan kuersetin kalus teh. Kalus pada media perlakuan  $Mn^{2+}$  5 mg/L memiliki kandungan kuersetin lebih tinggi jika dibandingkan dengan kalus pada media kontrol dan perlakuan  $Mn^{2+}$  1 mg/L. Kandungan flavonoid dan kuersetin kalus teh pada media kontrol dan perlakuan elisitasi selama 8 minggu lebih tinggi jika dibandingkan dengan 4 minggu.

### **5.2 Saran**

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan menambah lama kultur sehingga kalus mencapai fase stasioner sehingga diketahui bagaimana kandungan flavonoid maupun kuersetinnya. serta perlu juga dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai enzim-enzim yang terlibat dalam biosintesis kuersetin yang dipengaruhi oleh  $Mn^{2+}$ .

## DAFTAR PUSTAKA

- Ali, M. B., H. Eun-Joo, dan P. Kee-Yoeup. 2007. Methyl Jasmonate and Salicylic Acid Induce Oxidative Stress and Accumulation of Phenolic in Panax Ginseng Bioreactor Root Suspension Culture. *Molecule*. 1:607-621
- Anonimus. 2008. Kultur Suspensi. <http://e-learning.unram.ac.id/KulJar/BAB%20VII%20Kultur%20Kalus%20dan%20Suspensi/VII%20BAB%20VII.htm>. Diakses 5 Juli 2008
- Bioscience. 2008. Principles of Spectrophotometry. <http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/methods/protein/spectrophotometer.html>. Diakses 11 Februari 2008.
- Bors, W. , C, Michel dan K, Stettmaier. 2000. Electron paramagnetic resonance studies of radical species of proanthocyanidins and gallate esters. <http://www.the7thfire.com/PycProAnthocyanidins .htm>. Diakses 10 September 2007
- Boungard, F. A., Gravot, S. M dan E. Gontier. 2001. Production of Plant Secondary Metabolites: A Historical Perspective. *Plant Scienci*. 161:839-851
- Bratt, K. 2000. Secondary Plant Metabolites as Defense against Herbivores and Oxidative Stress. *Synthesis, Isolation and Biological Evaluation*. 567: 1-7
- Chlaimont, K. B., G. William, dan D. Hagar. 1985. Manganese Toxicity to Chlorophyll Synthesis in Tobacco Callus. *Plant Physiology*. 1:291-293
- Crystal S, A. Kevin, E. Lombard, B. Peffley, dan L. Weixin. 2003. "Genetic Analysis of Quercetin in Onion (*Allium cepa* L.) Lady Raider". *The Texas Journal of Agriculture and Natural Resource* 16: 24-28.

Dixon, R. A dan Nancy, L. P. 1995. Stress Induced Phenylpropanoid Metabolism. *Plant Cell*. 1:1085-1097

Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2003. Kanker Penyebab Kematian Keenam Terbesar di Indonesia. <http://www.depkes.go.id/index.php?option=news&task=viewarticle&sid=76&Itemid=2>. Diakses 11 Ferbuari. 2008

Fitriani, A. 2003. Kandungan Ajmalisin Pada Kultur Kalus *Catharanthus roseus* (L.) G. Don Setelah Dielisitasi Homogenat Jamur *Pythium aphanidermatum* Edson Fitzp. [http://tumoutou.net/6\\_sem2\\_023/any\\_fitriani.htm](http://tumoutou.net/6_sem2_023/any_fitriani.htm). Diakses 11 Januari 2008

Forrest, G.I, D.S Bendall. 1969. The Distribution of Polyphenols in the Tea Plant (*Camellia sinensis* L.). *Department of Biochemistri*. 118:741-755

Gamborg, O. L. 2002. Plant Tissue Culture Biotechnology. *In vitro Cellular and Developmental Biology*. 1:84-92

Sherington, P. H. 1993. Plant propagation by tissue culture. Part I. The Technology. Edington, Wilts, Exegetics Ltd. England.

Harborne, J. B. 1987. Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan. Edisi kedua. Alih bahasa: Kosasih Padmawinata. ITB. Bandung

Jedinak, A., J. Farago, I. Psenakova, dan T. Maliar. 2004. Approach to Flavonoid Production in Plant Tissue Culture. *Biologia Bratislava*. 59: 697 – 710.

Jemal, A., T. Murray, E. Ward, A. Samuels, R. C. Tiwari, A. Ghafoor, E. J. Feuer, dan M. J. Thun. 2005. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 55:10-30.

Johansson, J. 2005. Manganese Solubility due to Compaction in soils Under Corn and Soybean. *Sveriges Lunbruks University*. 1:1-28



- Kovalenko, P.G, Maliuta, S.S. 2002. Effect of The Elicitor on Secondary Metabolite Producton by Licorice (*Glycyrrhiza uralensis Fisch.*) Hair Roots Culture. *Department of Molecular Genetics, Institute of Molecular Biology and Genetics*. 150: 21-31.
- Kristina, N. N., R. Noveriza, S. F. Syahid, dan M. Rizal. 2007. Peluang Peningkatan Kadar Kurkumin Pada Tanaman Kunyit dan Temulawak. *Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik*. 1:1-12
- Lenny, S. 2006. Senyawa Flavonoida, Fenilprpanoidan dan Alkaloida. *Universitas Sumatera Utara*. 1:1-25
- Lindsey, K.Y. 1983. Novel Experiment System for Studying The Production of Secondary Metabolite By Plant Tissue Culture, dalam Mantel dan Smith. *Plant Biotechnoligy. Cambride University*. 1: 39-66
- Logerman, E. W. S., J. Schroder. , E. Schmelzer, I. E. Sommissich, dan K. Hahbrock. 1995. Gene Activation by UV Light, Fungal Elicitor or Fungal Infection in *Petroselinum crispum* in Correlated With Repression of Cell Cycle-Related Genes. *Plant Journal*. 8:865-876
- Misawa, M. 1994. Plant Tissue Culture: An Alternative for Production of Useful Metabolite. *Fao Agricultural Service Bulletin*. 1:108-112
- Namdeo, A. 2007. Plant Cell Elicitation for Production of Secondary Metabolites: A Review. *Pharmacognosy Reviews*. 1: 69-78
- Oulu university Library. 2003. Flavonoid Biosynthetic Pathway. <http://herkules oulu.fi/isbn9514271599/html/x155.html>. Diakses 2 Desember 2008
- Poole, C. F. 1997. Instrumental Thin Layer Chromatography. [http://www.chem-is-try.org/?sect=belajar&ext=analisis05\\_01](http://www.chem-is-try.org/?sect=belajar&ext=analisis05_01). Tanggal akses 02 Januari 2008

Pusat Penelitian Teh dan Kina. 2007. Teh dan Penelitian.  
[http://www.pn8.co.id/khasiat\\_teh.asp?mteh=Manfaat\\_Teh](http://www.pn8.co.id/khasiat_teh.asp?mteh=Manfaat_Teh).  
Diakses 10 Juni 2007

Punyasiri, P.A.N, I. S. B. Abesinghe, dan V. Kumar. 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

Rahayu, L. 2005. Perbandingan Kadar Tanin dalam Kalus Teh  
(*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) Tri 2025. <http://152.118.80.2/opac/themes/libri2/detail.jsp?id=75951&lokasi=lokal>.  
Diakses 20 Juni 2008

Rahmawati, Y. D. 2006. Pengaruh Jenis Gula Terhadap Akumulasi  
Isoflavon Pada Kalus Bengkuang (*Pachyrhizus erosus* (L).  
Urban). Skripsi

Robins, R. J. 1994. Secondary Product from Cultured Cell and  
Organs: Molecular and Cellular Approaches. Plant Cell Culture.  
A practical Approach. Second Edition. Oxford University Press.  
New York

Rodiana, D., W. Tantan. 2004. Aktivitas Antioksidan Beberapa Klon  
Teh. [http://www.iptek.net.id/ind/pustaka\\_pangan/index](http://www.iptek.net.id/ind/pustaka_pangan/index). Diakses  
11 Februari 2008

Ruyack, J., M. R. Downing, J. S. Chang, dan E. D. Mitchell. 2007.  
Growth Of Callus And Suspension Culture Cells From  
Cotton Varieties (*Gossypium hirsutum* L.) Resistant And  
Susceptible To *Xanthomonas Malvacearum* (E. F. Sm.)  
Dows. *In Vitro*. 5: 368 – 373.

Scalbert, A., W. Gary. 2000. Dietary Intake and Bioavailability of  
Polyphenols. *The American Society for Nutritional Science*.  
130:2073-2085

- Scragg, A. H. 1990. Alkaloid Secondary Products From *Chatarantus roseus*. Cell Suspension. *Method in Molecular Biology*. 6:537-544
- Setiawati, T. 2001. Pengaruh Pemberian Elisitor Yang Berasal dari Jamur *Verticilum dahliae* Terhadap Kandungan Gosipol dalam Kultur Akar. Tesis. 571.638
- Sibuea, P. 2004. Kuersetin Senjata Pemusnah Radikal Bebas.<http://kompas.com/kompascetak/0402/10/humaniora/840926.htm>. Diakses 11 Januari 2008
- Silva, J. J. R. F., R. J. P. William. 1993. The Biolocal Chemistry of The Elements. Clarendon Press. Oxford
- Sudha, G., G. A. Ravishankar,. 2002. Influence of Calcium Channel Modulators in Capsaicin Production by Cell Suspension Cultures of *Capsicum frutescens* Mill. *Research Communication*. 1:570-578
- Sukmaningrum, A. 2006. Pengaruh Ion Logam  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ , dan  $\text{Mn}^{2+}$  Terhadap Aumulasi Isoflavon pada Kalus Bengkuan (*Pachyrrizus erosus* (L.) Urb). Skripsi
- Sumaryono, I. Riyadi. 2005. Pertumbuhan Biak Kalus dan Suspensi Tanaman Kina. *Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia*. 1: 1-11
- Syahirah, I. 2008. Identifikasi Senyawa Isoflavon pada Limbah Cair Tahu. <http://iskandarmt.wordpress.com/>. Diakses 11 Februari 2008
- Taiz, L., E. Zeiger. 2002. Plant Physiology, 3<sup>rd</sup> Edition. Sinauer Associated. USA
- Tanindo. 2008. Pengaruh Unsur Esensial Terhadap Pertumbuhan dan Produksi Tanaman. <http://www.tanindo.com/abdi4/hal2701.htm>. Diakses 5 Juli 2008

- Thanonkeo, S., P. Sanha. 2006. Production of isoflavone, Daidzein and Genestein in Callus Culture of *Pueraria candollei* Wall. Ex Benth. Var *mirica*. *Songklanakarin J. Scienc. Technology*. 1:45-53
- Tolonen, Ari. 2003. Analysis of secondary Metabolites in plant and Cell culture tissue of *Hypericum perforatum* L and *rhodiola rosea* L. *Faculty of Science, University of Oulu*. 1:1-67.
- Wewetzer, A. 1998. Callus Culture of *Azadirachta indica* and Their Potential for The Production of Azadirachtin. *Phytoparasitica*. 47-52
- Wink, M. 1999. Function of Plant Secondary Metabolites and The Exploitation in Biotechnology. <http://www.liv.ac.uk/~sd21/tisscult/what.htm>. Diakses 11 Januari 2008
- Woude, H. 2006. Mechanisms of Toxic Action of The Flavonoid Quercetin and Its Phase II Metabolites. Thesis. 90-8504-349-2
- Yan. 2008. Teh Sebagai Minuman Kesehatan. <http://www.indomedia.com/Intisari/1999/oktober/teh.htm>. Diakses 11 Februari. 2008
- Zao, J., K. Sakai. 2002. Multiple Signalling Pathways Mediate Fungal Elicitor Induced  $\beta$ -Thujaplicin Biosynthesis in *Cupressus lusitanica* Cell Cultures. *Journal of Experimental Botany*. 54: 647-656

## LAMPIRAN

### Lampiran 1. Komposisi Larutan Stok Media MS dan Pembuatan Larutan Stok Elisitor

Tabel 5.1 Komposisi larutan stok media MS + 2,4 D dan kinetin

| Larutan Stok<br>(banyaknya<br>pengambilan) | Bahan                                               | Jumlah<br>(mg/L) | Berat (g)<br>untuk<br>volume<br>100 ml | Pengambilan<br>untuk 1 liter<br>media (ml) |
|--------------------------------------------|-----------------------------------------------------|------------------|----------------------------------------|--------------------------------------------|
| A (5x)                                     | NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>                     | 1650             | 8.28                                   | 20                                         |
| B (5x)                                     | KNO <sub>3</sub>                                    | 1900             | 9.50                                   | 20                                         |
| C (10x)                                    | CaCl <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O                 | 440              | 4.40                                   | 10                                         |
| D (10x)                                    | MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O                | 370              | 3.70                                   | 10                                         |
|                                            | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                     | 170              | 1.70                                   |                                            |
| E (20x)                                    | FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O                | 27,8             | 0.56                                   | 5                                          |
|                                            | Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O              | 37,3             | 0.75                                   |                                            |
| F (20x)                                    | H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                      | 6,2              | 0.12                                   | 5                                          |
|                                            | MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O                | 22,3             | 0.34                                   |                                            |
|                                            | ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O                | 8,6              | 0.17                                   |                                            |
| G (200x)                                   | KI                                                  | 0,83             | 0.2                                    | 0.5                                        |
|                                            | Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O | 0,25             | 0.05                                   |                                            |
|                                            | CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O                | 0,025            | 0.005                                  |                                            |
|                                            | CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O                | 0,025            | 0.005                                  |                                            |
| Vitamin<br>(100x)                          | Nicotinic acid                                      | 0,5              | 0.05                                   | 1                                          |
|                                            | Pyridoxine-HCl                                      | 0,5              | 0.05                                   |                                            |
|                                            | Thiamine-HCl                                        | 0,1              | 0.01                                   |                                            |
|                                            | Glycine                                             | 2                | 0.20                                   |                                            |
| Myo (10x)                                  | Myo-Inositol                                        | 100              | 1.00                                   | 10                                         |
| Zpt (100x)                                 | 2,4 D                                               | 1                | 0.10                                   | 1                                          |
|                                            | Kinetin                                             | 1                | 0.10                                   | 1                                          |

$$\begin{aligned}
 \text{Mn}^{2+} &= \frac{\text{BM MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}}{\text{BA Mn}} \times 100 \text{ mg} \\
 &= \frac{223}{55} \times 100 = 405,45 \text{ mg /100 ml}
 \end{aligned}$$



MnSO<sub>4</sub> .4 H<sub>2</sub>O dalam bentuk serbuk selanjutnya ditimbang sebanyak 0,405 g dan dilarutkan dalam 100 ml aquades (larutan stok Mn<sup>2+</sup> 100 ppm).

Tabel 5.2 Pengambilan larutan stok Mn<sup>2+</sup>

| ELisitor         | Konsentrasi Elisitor | Pengambilan untuk 1L media (ml) |
|------------------|----------------------|---------------------------------|
| Mn <sup>2+</sup> | 1                    | 0,1                             |
|                  | 5                    | 0,5                             |
|                  | 10                   | 1                               |

## Lampiran 2. Pertumbuhan Kalus Teh

Tabel 5.3 Rata-rata berat basah kalus selama 8 minggu

| Konsentrasi Elisitor (mg/L) | Lama Kultur (minggu) | Berat basah (g) ± SD (n=4) |
|-----------------------------|----------------------|----------------------------|
| 0                           | 0                    | 0,040 ± 0                  |
|                             | 2                    | 0,065 ± 0,01               |
|                             | 4                    | 0,119 ± 0,02               |
|                             | 6                    | 0,170 ± 0,05               |
|                             | 8                    | 0,211 ± 0,06               |
| 1                           | 0                    | 0,040 ± 0                  |
|                             | 2                    | 0,065 ± 0,01               |
|                             | 4                    | 0,134 ± 0,02               |
|                             | 6                    | 0,188 ± 0,04               |
|                             | 8                    | 0,235 ± 0,06               |
| 5                           | 0                    | 0,040 ± 0                  |
|                             | 2                    | 0,066 ± 0,01               |
|                             | 4                    | 0,120 ± 0,02               |
|                             | 6                    | 0,160 ± 0,03               |
|                             | 8                    | 0,199 ± 0,03               |
| 10                          | 0                    | 0,040 ± 0                  |
|                             | 2                    | 0,080 ± 0,01               |
|                             | 4                    | 0,140 ± 0,03               |
|                             | 6                    | 0,185 ± 0,05               |
|                             | 8                    | 0,238 ± 0,08               |

Tabel 5.4 Rata-rata berat basah dan berat kering kalus pada media dengan berbagai konsentrasi  $Mn^{2+}$  dengan lama kultur 4 dan 8 Minggu

| Konsentrasi<br>Elisitor<br>(mg/L) | Lama<br>kultur<br>(minggu) | Berat basah (BB)<br>(g) $\pm$ SD (n=10) | Berat kering<br>(BK) (g) $\pm$ SD (n=10) |
|-----------------------------------|----------------------------|-----------------------------------------|------------------------------------------|
| 0                                 | 4                          | 0,132 $\pm$ 0,04                        | 0,016 $\pm$ 0,005                        |
|                                   | 8                          | 0,240 $\pm$ 0,05                        | 0,031 $\pm$ 0,006                        |
| 1                                 | 4                          | 0,132 $\pm$ 0,03                        | 0,017 $\pm$ 0,005                        |
|                                   | 8                          | 0,210 $\pm$ 0,02                        | 0,027 $\pm$ 0,004                        |
| 5                                 | 4                          | 0,126 $\pm$ 0,02                        | 0,017 $\pm$ 0,003                        |
|                                   | 8                          | 0,224 $\pm$ 0,02                        | 0,030 $\pm$ 0,001                        |
| 10                                | 4                          | 0,141 $\pm$ 0,03                        | 0,018 $\pm$ 0,004                        |
|                                   | 8                          | 0,214 $\pm$ 0,05                        | 0,027 $\pm$ 0,005                        |

### Lampiran 3. Kandungan Flavonoid Kalus Teh

Tabel 5.5 Rata-rata kandungan flavonoid kalus pada berbagai konsentrasi  $Mn^{2+}$  dengan lama kultur 4 dan 8 minggu

| Lama<br>kultur<br>(minggu) | Konsentrasi<br>Mn (mg/L) | Absorbansi<br>(425 nm) | Kandungan<br>flavonoid (%) $\pm$<br>SD (n=2) | Kandungan<br>flavonoid<br>( $\mu$ g/mg) $\pm$ SD<br>(n=2) |
|----------------------------|--------------------------|------------------------|----------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| 4                          | 0                        | 0,336                  | 0,073 $\pm$ 0,012                            | 9,39 $\pm$ 1,52                                           |
|                            | 1                        | 0,298                  | 0,079 $\pm$ 0,004                            | 8,91 $\pm$ 0,53                                           |
|                            | 5                        | 0,290                  | 0,061 $\pm$ 0,004                            | 8,63 $\pm$ 0,57                                           |
|                            | 10                       | 0,290                  | 0,066 $\pm$ 0,001                            | 8,93 $\pm$ 0,15                                           |
| 8                          | 0                        | 0,334                  | 0,083 $\pm$ 0,004                            | 11,15 $\pm$ 0,62                                          |
|                            | 1                        | 0,312                  | 0,086 $\pm$ 0,019                            | 11,70 $\pm$ 2,80                                          |
|                            | 5                        | 0,315                  | 0,091 $\pm$ 0,031                            | 12,96 $\pm$ 4,45                                          |
|                            | 10                       | 0,342                  | 0,086 $\pm$ 0,009                            | 11,60 $\pm$ 1,34                                          |

Kandunga flavonoid dihitung menggunakan rumus berdasarkan metode Yuliani dkk (2003):

$$\begin{aligned} \% \text{ Flavonoid} &= A \times 0,735/g \\ g &= (100 - KA)\% \times W \\ KA &= \frac{W_{60^\circ} - W_{110^\circ}}{W_{60^\circ}} \times 100 \% \end{aligned}$$

Keterangan:

A = absorbansi sampel

KA = susut pengeringan (% b/b)

$$= \frac{W_{60^\circ} - W_{110^\circ}}{W_{60^\circ}} \times 100 \%$$

W = berat sampel sesuai dengan penimbangan (g)

#### Lampiran 4. Kandungan Kuerseti Kalus Teh

Tabel 5.6 Rata-rata kandungan kuersetin kalus teh pada masing-masing perlakuan

| Lama kultur (minggu) | Konsentrasi Mn (mg/L) | Luas area (cm) | Konsentrasi kuersetin pada plat/20 ul | Kandungan kuersetin (ng/mg) $\pm$ SD (n=2) |
|----------------------|-----------------------|----------------|---------------------------------------|--------------------------------------------|
| 4                    | 0                     | 0,100          | 1625                                  | 86,09 $\pm$ 3,75                           |
|                      | 1                     | 0,140          | 1825                                  | 96,69 $\pm$ 11,24                          |
|                      | 5                     | 0,260          | 2425                                  | 128,48 $\pm$ 18,73                         |
|                      | 10                    | 0,205          | 2150                                  | 113,91 $\pm$ 16,86                         |
| 8                    | 0                     | 0,125          | 1750                                  | 92,72 $\pm$ 5,62                           |
|                      | 1                     | 0,150          | 1875                                  | 99,34 $\pm$ 14,99                          |
|                      | 5                     | 0,285          | 2550                                  | 135,10 $\pm$ 1,87                          |
|                      | 10                    | 0,215          | 2200                                  | 116,58 $\pm$ 13,11                         |

Kandungan kuersetin diperoleh melalui rumus:

$$\text{KQ: } \frac{\frac{V_{\text{ekstrak}}}{V_{\text{totolan}}} \times \text{KW}}{\text{Berat sampel}} \times \frac{100}{(100-\text{KA})}$$

Keterangan:

KQ : konsentrasi kuersetin (ng/mg)

$V_{\text{ekstrak}}$  : volume ekstrak (ml)

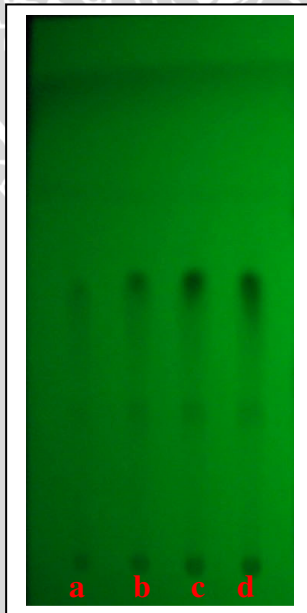
$V_{\text{totolan}}$  : volume totolan ( $\mu\text{l}$ )

KW : konsentrasi kuersetin pada plat (ng/20 $\mu\text{l}$ )

: (luas area + 0,225)/0,0002

KA : susut pengeringan (%b/b)

:  $\frac{W_{60^\circ} - W_{110^\circ}}{W_{60^\circ}} \times 100\%$



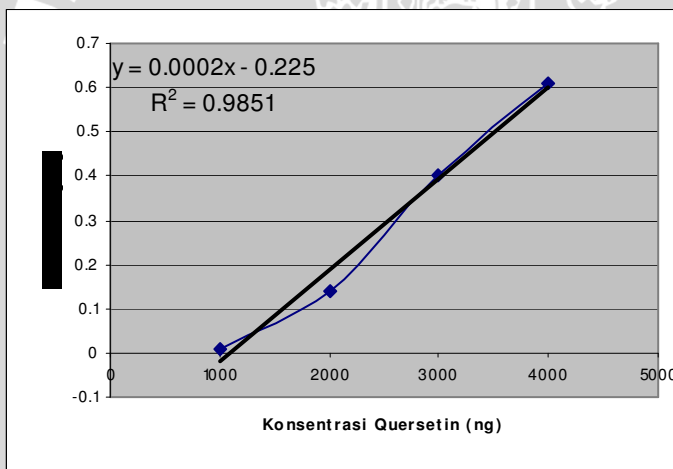
Gambar 5.1 Hasil KLT standar kuersetin: a: 1000 ng, b: 2000 ng, c: 3000 ng, d: 4000 ng

Hasil KLT standar kuersetin pada plat selanjutnya dianalisis menggunakan program TLSee 2.0 sehingga diperoleh nilai luas area masing –masing standar (Tabel 4.2)

Tabel 5.7 Nilai luas area standar kuersetin

| Konsentrasi kuersetin<br>(ng) | Luas area<br>(cm) |
|-------------------------------|-------------------|
| 1000                          | 0,01              |
| 2000                          | 0,14              |
| 3000                          | 0,4               |
| 4000                          | 0,61              |

luas area yang diperoleh selanjutnya dibuat grafik kuva standar seperti dibawah ini:

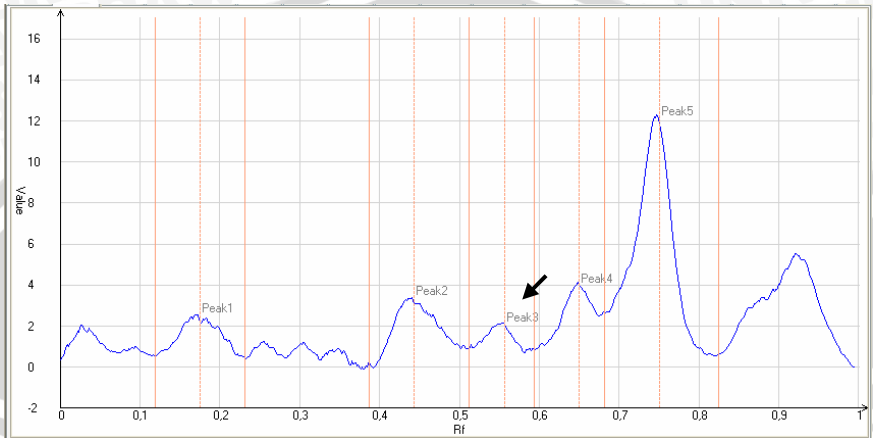


Gambar 5.2 Kurva standar kuersetin

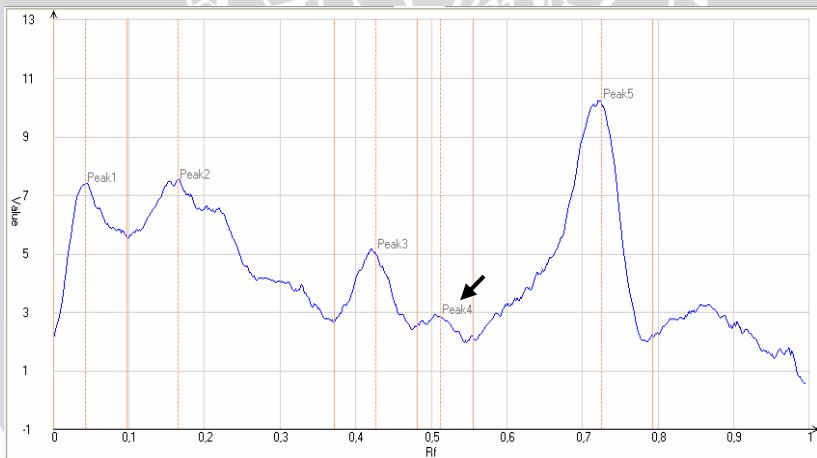
Hasil kesemua sampel yang telah ditotol pada plat kemudian di analisis menggunakan program TLSee 2.0 sehingga muncul gambaran analisis yang berupa kurva yang mana masingmasing kuva memiliki luas area tertentu. Letak kurva kuersetin ditunjukkan dengan panah seperti yang tampak pada lampiran 5



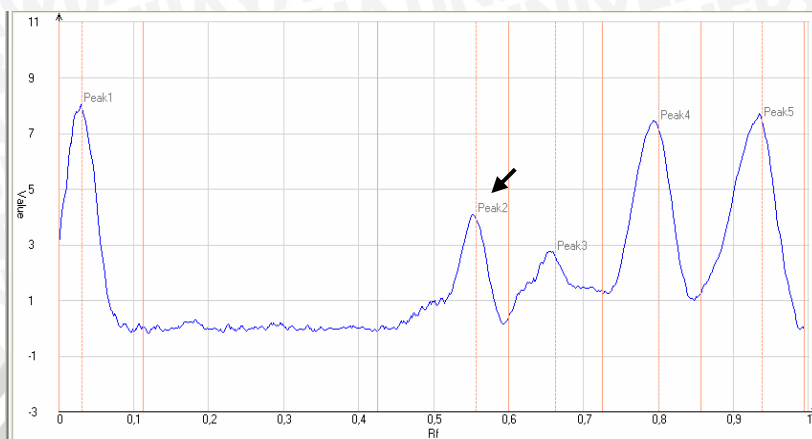
## Lampiran 5. Analisis KLT Kandungan Kuersetin Ekstrak Kalus Teh



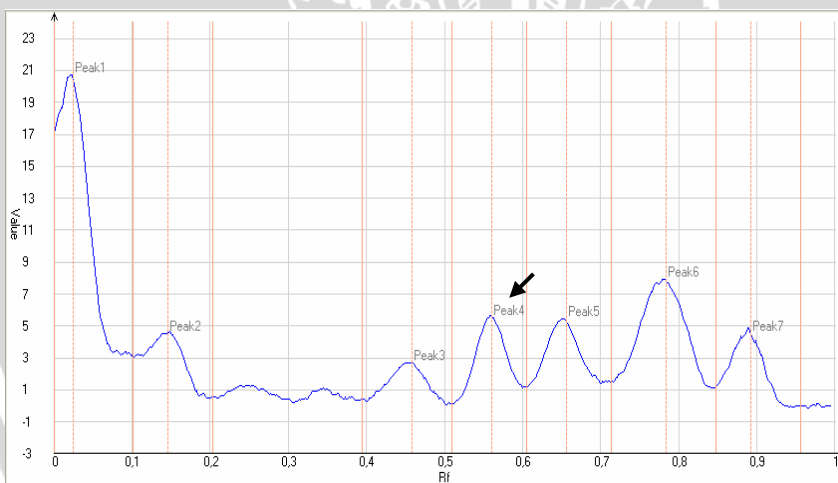
Gambar 5.3 Analisis KLT kandungan kuersetin ekstrak kalus teh perlakuan 0  $Mn^{2+}$  pada lama kultur 4 minggu



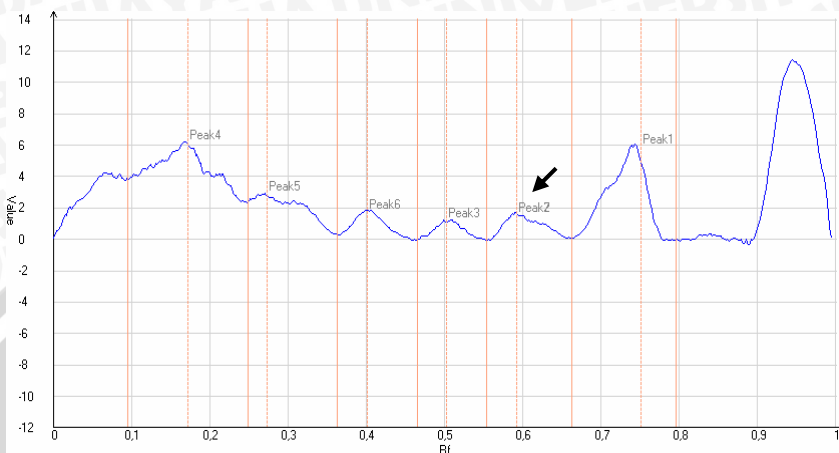
Gambar 5.4 Analisis KLT kandungan kuersetin ekstrak kalus teh perlakuan 1 mg/L  $Mn^{2+}$  pada lama kultur 4 minggu



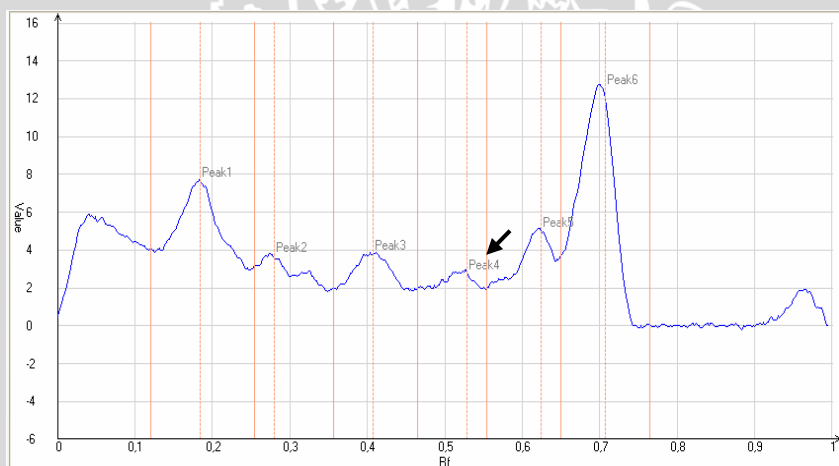
Gambar 5.5 Analisis KLT kandungan kuersetin ekstrak kalus teh perlakuan 5 mg/L  $Mn^{2+}$  pada lama kultur 4 minggu



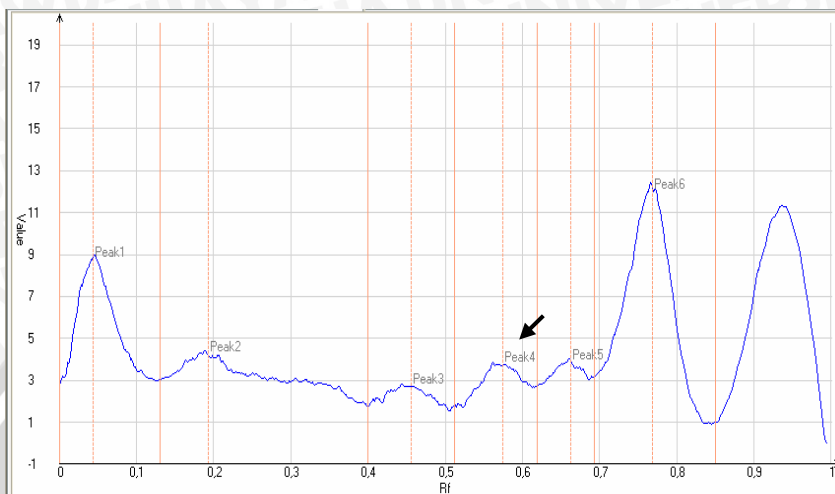
Gambar 5.6 Analisis KLT kandungan kuersetin ekstrak kalus teh perlakuan 10 mg/L  $Mn^{2+}$  pada lama kultur 4 minggu



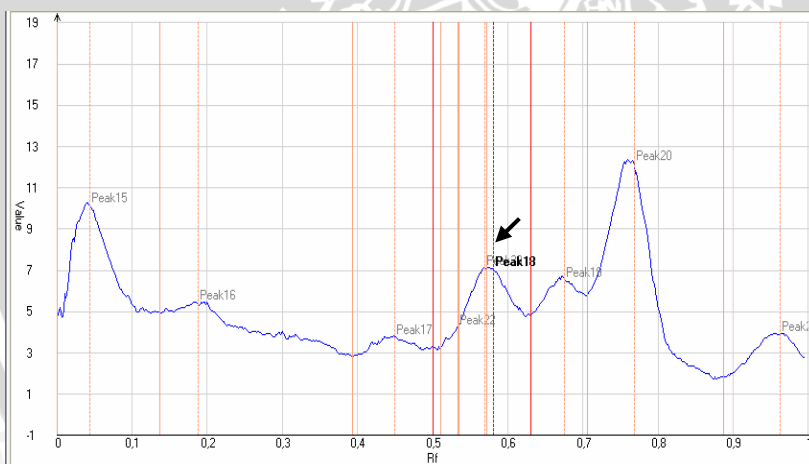
Gambar 5.7 Analisis KLT kandungan kuersetin ekstrak kalus teh perlakuan 0 mg/L  $Mn^{2+}$  pada lama kultur 4 minggu



Gambar 5.8 Analisis KLT kandungan kuersetin ekstrak kalus teh perlakuan 1 mg/L  $Mn^{2+}$  pada lama kultur 8 minggu



Gambar 5.9 Analisis KLT kandungan kuersetin ekstrak kalus teh perlakuan 5 mg/L  $Mn^{2+}$  pada lama kultur 8 minggu



Gambar 5.10 Analisis KLT kandungan kuersetin ekstrak kalus teh perlakuan 10 mg/L  $Mn^{2+}$  pada lama kultur 8 minggu

## Lampiran 6. Analisis Statistik

Tabel 5.8 Analisis ragam pengaruh  $Mn^{2+}$  pada pertumbuhan kalus teh

| Sumber Keragaman      | JK    | db | KT    | Fhit   | Sig*  |
|-----------------------|-------|----|-------|--------|-------|
| Konsentrasi $Mn^{2+}$ | 0,005 | 3  | 0,002 | 1,618  | 0,193 |
| Minggu                | 0,353 | 4  | 0,088 | 81,817 | 0,000 |
| Galat                 | 0,078 | 72 | 0,001 |        |       |
| Total                 | 0,436 | 79 |       |        |       |

Tabel 5.9 Analisis ragam pengaruh  $Mn^{2+}$  dan lama kultur pada berat basah kalus teh

| Sumber Keragaman                      | JK    | db | KT    | Fhit   | Sig*  |
|---------------------------------------|-------|----|-------|--------|-------|
| Lama kultur                           | 0,159 | 1  | 0,159 | 92.552 | 0,000 |
| Konsentrasi $Mn^{2+}$                 | 0,002 | 3  | 0,001 | 0,459  | 0,712 |
| Lama kultur*<br>Konsentrasi $Mn^{2+}$ | 0,004 | 3  | 0,001 | 0,743  | 0,530 |
| Galat                                 | 0,124 | 72 | 0,002 |        |       |

Tabel 5.10 Analisis ragam pengaruh  $Mn^{2+}$  dan lama kultur pada berat kering kalus teh

| Sumber Keragaman                      | JK    | db | KT    | Fhit   | Sig*  |
|---------------------------------------|-------|----|-------|--------|-------|
| Lama kultur                           | 0,003 | 1  | 0,003 | 89.879 | 0,000 |
| Konsentrasi $Mn^{2+}$                 | 0,000 | 3  | 0,000 | 0,309  | 0,819 |
| Lama kultur*<br>Konsentrasi $Mn^{2+}$ | 0,000 | 3  | 0,000 | 0,796  | 0,500 |
| Galat                                 | 0,002 | 72 | 0,000 |        |       |



Tabel 5.11 Analisis ragam pengaruh  $Mn^{2+}$  dan lama kultur pada kandungan flavonoid kalus teh

| Sumber Keragaman      | JK         | Db | KT         | Fhit  | Sig*  |
|-----------------------|------------|----|------------|-------|-------|
| Lama kultur           | 112225,000 | 1  | 112225,000 | 5.392 | 0,049 |
| Konsentrasi $Mn^{2+}$ | 11400,000  | 3  | 3800,000   | 0,183 | 0,905 |
| Lama kultur*          | 32675,000  | 3  | 10891,667  | 0,523 | 0,678 |
| Konsentrasi $Mn^{2+}$ |            |    |            |       |       |
| Galat                 | 166500,000 | 8  | 20812,500  |       |       |

Tabel 5.12 Analisis ragam pengaruh  $Mn^{2+}$  dan lama kultur pada kandungan kuersetin kalus teh

| Sumber Keragaman      | JK         | Db | KT        | Fhit  | Sig*  |
|-----------------------|------------|----|-----------|-------|-------|
| Lama kultur           | 10859,203  | 1  | 10859,203 | 1.209 | 0,303 |
| Konsentrasi $Mn^{2+}$ | 166287,587 | 3  | 55429,196 | 6.172 | 0,018 |
| Lama kultur *         | 5019,556   | 3  | 1673,185  | 0,186 | 0,903 |
| Konsentrasi $Mn^{2+}$ |            |    |           |       |       |
| Galat                 | 71841,698  | 8  | 8980,212  |       |       |