I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Robx. Synm. *Curcuma javanica*) ialah tanaman asli Indonesia yang mempunyai potensial untuk dikembangkan dan memiliki banyak manfaat sebagai bahan obat. Bagian tanaman temulawak yang dijadikan sebagai bahan baku obat yaitu rimpang, yang mengandung bahan aktif antara lain kurkuminoid dan minyak atsiri. Rimpang temulawak yang berkhasiat obat digunakan untuk mengatasi kelainan pada hati/lever, kantong empedu serta pankreas. Dari hasil analisis kimia diketahui bahwa temulawak mengandung komponen utama berupa pati, abu, serat, kurkumin, lemak, protein dan minyak atsiri

Orientasi budidaya tanaman temulawak tidak hanya ditujukan pada produktivitas biomas, tetapi juga mutu bahan aktif yang terkandung di dalam temulawak. Akan tetapi kendalanya adalah masih banyak temulawak yang memiliki kandungan kurkuminoid rendah dengan kandungan hanya berkisar 0,58-0,79 %. Keberhasilan sintesis kurkumin dipengaruhi oleh faktor lingkungan tumbuh, sifat unggul bibit, ketersediaan unsur hara, perlindungan tanaman dan penanganan pasca panen. Berbeda dengan unsur hara makro yang dibutuhkan tanaman dalam jumlah yang banyak, unsur hara mikro yang kebutuhannya sedikit tetapi dapat mempengaruhi pertumbuhan dan kualitas tanaman temulawak.

Ketersediaan unsur hara mikro esensial B, Fe dan Zn mempengaruhi pertumbuhan dan kurkumin temulawak. Selain itu, ketersediaan unsur hara mikro lain seperti Cu melakukan fungsi fisiologis dan biokimia yang sangat penting. Cu dibutuhkan dalam proses fotosintesis, respirasi, transportasi karbohidrat dan juga mengatur proses pembentukan DNA. Cu dibutuhkan oleh tanaman dalam jumlah yang sedikit tetapi dapat menjadi racun jika dalam jumlah yang berlebih. Disamping itu, unsur Mo berfungsi sebagai kofaktor untuk enzim reduktase nitrat. Nitrat reduktase mengkatalisis langkah pertama dalam asimilasi nitrat, merupakan kunci penting untuk nutrisi tanaman. Kekurangan Mo mengurangi aktivitas nitrat reduktase, yang menghambat kemampuan tanaman dalam sintesis protein. Untuk mendapatkan hasil yang maksimal terkait peningkatan konsentrasi unsur mikro terhadap pertumbuhan dan kadar kurkumin dilakukan secara *in vitro*, sehingga

dapat dikontrol ketersediaan unsur hara mikro sesuai perlakuan dan kebutuhan tanaman.

1.2 Tujuan

Tujuan penelitian ini ialah untuk mendapatkan hasil pertumbuhan dan kadar kurkumin temulawak maksimum dengan penambahan berbagai konsentrasi unsur hara mikro Cu atau Mo secara *in vitro*.

1.3 Hipotesis

Pemberian beberapa konsentrasi unsur Cu atau Mo memberikan pengaruh yang berbeda pada pertumbuhan dan hasil kurkumin temulawak secara *in vitro*.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Morfologi dan Fungsi Tanaman Temulawak (*Curcuma xanthorriza* Roxb Synm. *Curcuma javanica*)

Curcuma xanthorriza Robx (Synm. *Curcuma javanica*) sering disebut temulawak, merupakan tanaman obat asli Indonesia dan termasuk salah satu temu-temuan yang paling banyak digunakan sebagai bahan baku obat tradisional. Penyebaran temulawak di Indonesia cukup luas, sehingga tanaman ini dikenal dengan berbagai nama daerah, misalnya kunyit ketumbu (Aceh), koneng gede (Jawa Barat), temulobak (Madura), tommo (Bali), atau ternate dengan nama karbaga (Afifah, 2004). Menurut Plantamor (2013), adapun temulawak termasuk famili Zingiberaceae dengan genus Curcuma dan nama spesies temulawak adalah *Curcuma xanthorriza* Robx.

Tanaman ini sering kali ditemukan dalam semak hutan jati, tetapi ada juga yang ditanam atau dibudidayakan, khususnya di daerah pulau Jawa. Temulawak merupakan terna tahunan, berbatang semu yang berwarna hijau dan rimpang berwarna coklat gelap. Batangnya tersusun atas upih-upih daun, seperti halnya yang ada pada pisang, tumbuh tegak lurus, dan berumpun. Daunnya berbentuk seperti mata lembing jorong agak melonjong (*oblong elliptic*). Sebagai tanaman monokotil, temulawak tidak memiliki akar tunggang, akar yang dipunyai adalah rimpang. Rimpang temulawak terdiri dari rimpang induk (empu) dan rimpang anakan (cabang). Rimpang temulawak berbentuk telur (silinder pusat, berwarna kuning tua dan kulit berwarna kuning-muda), dengan garis diameter sampai 6 cm. Bagian dalamnya berwarna jingga kecoklatan. Bunga temulawak pendek dan lebar, berwarna putih kuning atau kuning muda bercampur warna merah di puncaknya. Bunga mekar satu per satu secara bergiliran dari kantung-kantung daun pelindung yang memiliki 3-5 kuntum bunga (Afifah, 2004).

Menurut Afifah (2004), temulawak termasuk tanaman yang prospektif untuk dikembangkan karena aneka khasiat dan manfaat temulawak, yaitu sebagai obat, sumber karbohidrat, bahan penyedap masakan dan minuman, serta pewarna alami untuk masakan dan kosmetika. Rimpang temulawak mengandung zat kuning kurkumin, minyak atsiri, pati, protein, lemak (*fixed oil*), selulosa dan mineral. Komponen utama yang berkhasiat sebagai obat dalam rimpang temulawak adalah

kurkuminoid dan minyak atsiri yang merupakan hasil metabolisme sekunder dari tanaman ini (Fatmawati, 2008).

Tabel 1. Komposisi rimpang temulawak

Komponen Bahan aktif	Besaran (%)
Pati	27,62
Lemak	5,38
Kurkumin	1,93
Serat Kasar	6,89
Abu	3,96
Protein	6,44
Minyak atsiri	10,96

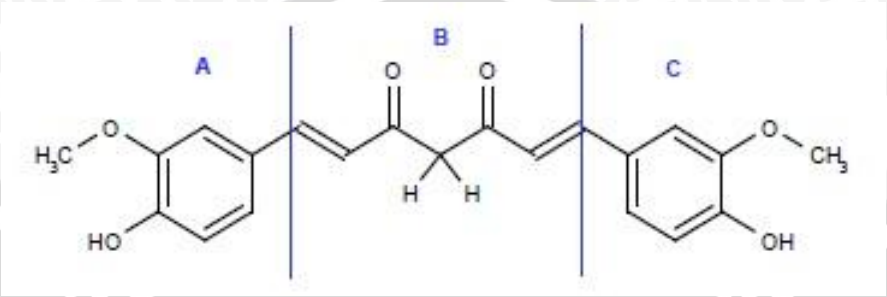
Sumber : Suwiah (1991) *dalam* Fatmawati (2008)

Kandungan bahan aktif rimpang temulawak yang memberi arti pada penggunaannya dibedakan atas beberapa macam yaitu kurkuminoid yang memberi warna kuning, pati dapat dikembangkan sebagai bahan makanan dan minyak atsiri. Minyak atsiri rimpang temulawak digunakan dalam bidang medis sebagai aromaterapi, yaitu fitorepi yang menggunakan minyak atsiri sebagai komponen aktifnya. Dari hasil pengujian kualitatif skrining fitokimia diperoleh bahwa di dalam rimpang temulawak terdapat alkaloid, flavonoid, fenolik, saponin, triterpennoid dan glikosida (Hayani, 2006).

Zat kurkuminoid berkhasiat menetralkan racun, menghilangkan rasa nyeri sendi, menurunkan kadar kolesterol dan trigliserida darah, antibakteri, dan sebagai antioksidan, penangkal senyawa-senyawa radikal bebas yang berbahaya. Sedangkan minyak atsiri pada temulawak berkhasiat sebagai *colagoga*, yaitu bahan yang dapat merangsang pengeluaran cairan empedu yang berfungsi sebagai penambah nafsu makan dan anti *spasmodicum*, yaitu menenangkan dan mengembalikan kekejangan otot (Liang *et al*., 1985 *dalam* Fatmawati, 2008). Menurut Fatmawati (2008) xanthorrizol yang terkandung dalam minyak atsiri secara efisien dapat menghambat infeksi pada gigi dan penyakit kulit, dapat dimanfaatkan pada berbagai produk misalnya digunakan sebagai agen anti bakteri, pasta gigi, sabun, pembersih mulut, permen karet dan kosmetik yang memerlukan aktivitas antibakteri.

2.2 Biosintesis Kurkumin

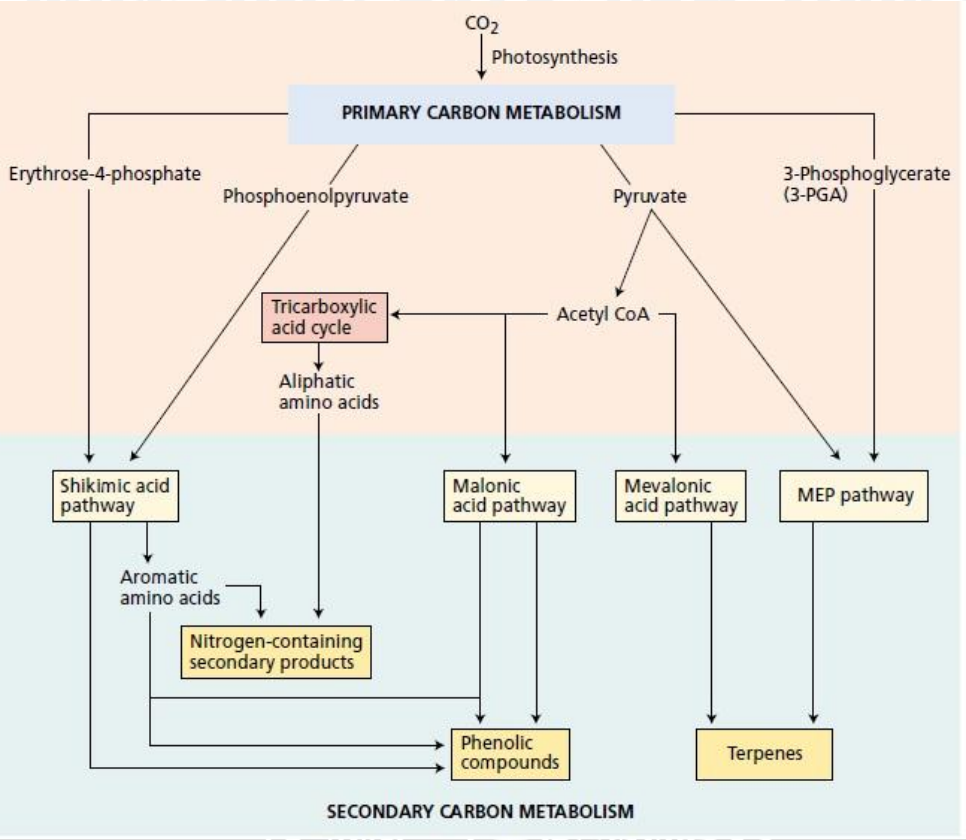
Kurkumin merupakan penyumbang warna utama pada rimpang tanaman Curcuma. Oleh karena itu, banyak digunakan sebagai bahan pewarna alami pada makanan, obat-obatan, kosmetik, maupun tekstil. Stabilitas kurkumin sangat dipengaruhi oleh pH lingkungan dan cahaya. (Da'i *et al*., 2010).



Gambar 1. Struktur Kurkumin (Da'i *et al*., 2010)

Struktur molekul kurkumin dibagi menjadi tiga daerah bagian farmakofor. Bagian A dan C merupakan cincin aromatis, sedangkan bagian B merupakan ikatan dien-dion (Da'i *et al*., 2010). Hubungan struktur dan aktivitas kurkumin terkait dengan gugus-gugus fungsional senyawa tersebut, yaitu : a) Gugus hidroksi pada cincin aromatik menunjukkan aktivitas antioksidan pada senyawa kurkumin; b) Gugus keton berperan dalam aktivitas biologis sebagai antiinflamasi dan antikanker; dan c) Dua cincin aromatis simetris ataupun tidak simetris menentukan potensi ikatan antara senyawa obat dengan reseptor (Susilawati, 2013).

Kurkumin merupakan senyawa sekunder kelompok fenol yang terbentuk melalui jalur asam shikimat dan asam malonat dari prekusor karbohidrat sederhana menjadi asam amino aromatik (Nihayati, 2013). Fenil-alanin merupakan salah satu asam amino aromatik, senyawa ini diproses menjadi trans-asam sinamat, menghasilkan fenol sederhana dan fenol kompleks (Taiz dan Zieger, 2007). Kurkumin terbentuk dari 2 unit fenilpropaniod berasal dari fenilalanin dan satu unit karbon berasal dari asam malonat (Kita *et al*., 2008).



Gambar 2. Metabolisme Sekunder (Taiz dan Zieger, 2002)

PAL (phenilalanin amonia lyase) merupakan enzim penentu dalam sintesis kurkumin, karena posisinya pada metabolisme pada tanaman berada pada titik persimpangan metabolit primer dan sekunder, pada jaringan tanaman enzim tersebut meningkat pada kondisi lingkungan tertentu (Taiz dan Zieger, 2002). Jumlah metabolit yang dihasilkan oleh daun dan proporsi yang ditranslokasikan ke rimpang akan sangat mempengaruhi ukuran dan hasil rimpang, biosintesis dan akumulasi kurkumin, sehingga perkembangan rimpang dan akumulasi kurkumin tergantung pada translokasi yang terbentuk dari daun (Dixit *et al*., 2002 *dalam* Nihayati, 2013).

2.3 Peran Unsur Cu pada Metabolit Sekunder

Dalam pertumbuhan dan perkembangan hidupnya, tanaman membutuhkan unsur esensial yakni unsur hara makro yang dibutuhkan dalam jumlah relatif banyak dan unsur mikro yang dibutuhkan tanaman dalam jumlah relatif sedikit. Dalam siklus hidup tanaman, unsur hara mikro disamping dibutuhkan dalam

jumlah yang sedikit, juga mempunyai batas optimum yang sempit, sehingga dalam jumlah berlebihan sedikit saja dapat menjadi racun bagi tanaman (Silalahi, 2006). Unsur hara mikro diserap tanaman dalam bentuk kation (Fe^{2+} ; Mn^{2+} ; Zn^{2+} ; Cu^{2+}) dan anion (Cl^{-} ; BO_2^{2-} ; MoO_4^{2-}) (Gardner *et al*., 2008). Adapun fungsi unsur hara mikro di dalam tanaman adalah sebagai berikut :

Tabel 2. Fungsi Unsur Hara Mikro Pada Tanaman

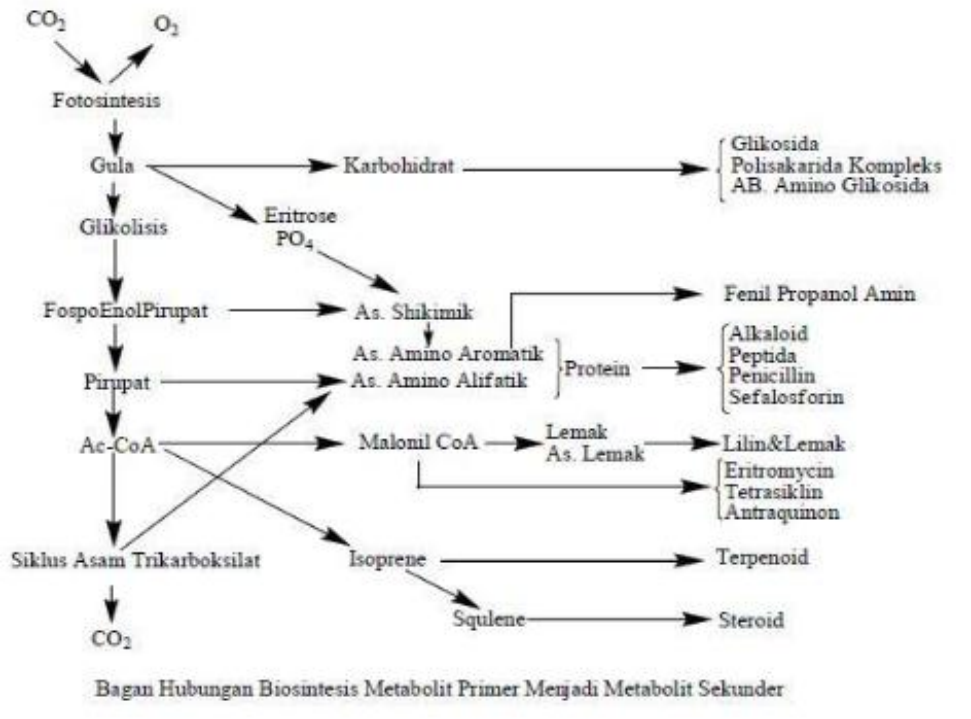
Hara Mikro	Fungsi Dalam Tanaman
Zn	Digunakan dalam formasi auxin, kloplast dan serat
Cu	Penyusun enzim-enzim sintesis klorofil, katalisator dalam respirasi, metabolisme protein dan karbohidrat
Mn	Sintesa klorofil, penyusun coenzim
B	Pembelahan sel, metabolisme nitrogen, pergerakan hormon
Mo	Penting dalam berbagai sistem enzim untuk nitrat reduktase
Cl	Fosforilasi fotosintetik

Sumber : Silalahi (2006)

Strategi yang sering dilakukan untuk mempengaruhi produksi metabolit sekunder pada metode kultur jaringan adalah suatu seri kadar elemen mikro dalam media dan atau penambahan senyawa tertentu. Unsur hara logam (Cu, Zn, Fe dan Mn) menjalankan fungsi biokimia dan fisiologis pada tanaman dan hewan. Dua fungsi utama unsur hara logam adalah sebagai berikut : (a) Partisipasi dalam reaksi redoks; dan (b) Partisipasi langsung, menjadi bagian integral dari beberapa enzim (Nagajyoti *et al*., 2010). Logam salah satu unsur mikro yang penting diperlukan untuk pertumbuhan tanaman sehat dalam jumlah yang terbatas (sedikit) tetapi dapat menjadi racun dalam jumlah yang berlebih (Haydon dan Cobbett, 2007).

Di dalam tanaman, Cu berperan dalam fotosintesis, karena merupakan penyusun enzim kloroplas plastosianin dalam sistem transpor elektron antara fotosistem I dan II. Plastosianin, protein tembaga tipe I ditemukan pada tanaman dan kloroplas alga, berfungsi dalam fotosintesis sebagai elektron mobile pembawa antara sitokrom terikat membran b_6-*f* kompleks dan P-700, pusat reaksi fotosistem I. Seperti yang dikemukakan oleh Podlesna (1996) *dalam* Al-Mayahi (2014) Cu dibutuhkan dalam proses fotosintesis, respirasi, transportasi karbohidrat dan juga mengatur proses pembentukan DNA. Kebanyakan Cu dijumpai di dalam organel

pada tanaman, dan berperan penting bagi tanaman terutama untuk fotosintesis (Gardner *et al*., 2008; Nagajyoti *et al*., 2010).



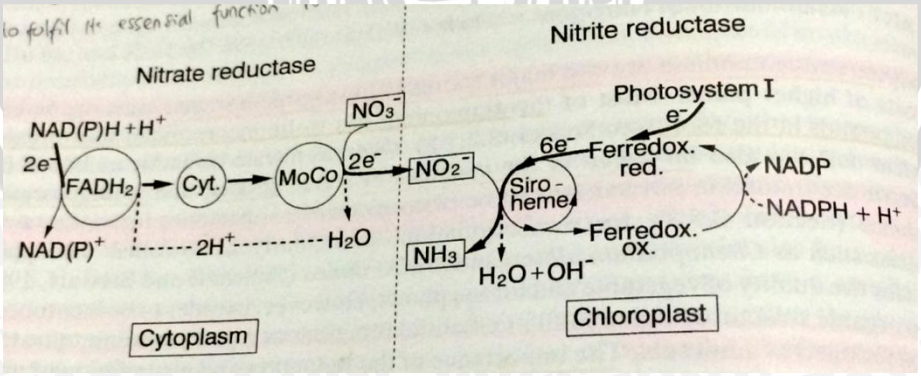
Gambar 3. Hubungan Biosintesis Metabolit Primer Menjadi Metabolit Sekunder (Matsjeh, 2004)

Hasil metabolit primer akan berhubungan untuk pembentukan metabolit sekunder. Fenolik yang dihasilkan oleh metabolisme sekunder merupakan turunan dari asam shikimat dan asam pirufat, yaitu senyawa yang diturunkan dari karbohidrat hasil fotosintesis tanaman (Matsjeh, 2004). Selain pada proses fotosintesis logam Cu merupakan elisitor unsur mikro. Elisitor adalah senyawa biologis dan non biologis yang dapat merangsang produksi metabolit sekunder bila ditambahkan pada tumbuhan atau kultur sel tumbuhan. Penambahan unsur Cu pada konsentrasi 5 ppm mampu meningkatkan kecepatan inisiasi pembentukan tunas, jumlah dan tinggi tunas, serta morfologi tunas pada tanaman obat jaka tuwa (*Scoparia dulcis* L.) secara *in vitro* (Aini, 2013). Berdasarkan penelitian Lee *et al*., (1996), tanaman geranium dengan perlakuan peningkatan kadar Cu menunjukan gejala daun menguning dengan penurunan kadar klorofil.

2.4 Peran Unsur Mo pada Metabolit Sekunder

Molibdenum (Mo) merupakan salah satu unsur hara mikro yang diperlukan untuk pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Mo merupakan elemen yang sangat jarang (Mendel, 2002). Molibdenum (Mo) tampaknya merupakan unsur yang relatif bergerak pada tanaman dan konsentrasi tertinggi dapat ditemukan dalam akar dibandingkan pada daun ketika persediaan terbatas. Konsentrasi pada daun dapat meningkat karena pasokan molibdenum meningkat (Lohry, 2007). Armiadi (2009) mengemukakan bahwa molibdenum yang terdapat dalam enzim berperan sangat penting dalam sistem biologi dan berfungsi penting dalam berbagai proses metabolisme.

Fungsi molibdenum dalam tumbuhan yang diketahui adalah menjadi bagian dari enzim nitrat reduktase yang mereduksi ion nitrat menjadi ion nitrit, mengaktifkan enzim nitrogenase dan xantine oksidase (Gardner *et al*., 2008; Armiadi, 2009). Nitrat reduktase mengkatalisis langkah dalam asimilasi nitrat, merupakan kunci penting dalam nutrisi tanaman. Kekurangan molibdenum mengurangi aktitivitas nitrat reduktase, yang menghambat kemampuan tanaman dalam sintesis protein (Lohry, 2007). Enzim adalah katalisator reaksi-spesifik kimia pada sistem biologi. Sebagian besar reaksi sel-sel hidup akan berlangsung sangat lambat bila reaksi tersebut tidak dikatalisis oleh enzim. Untuk dapat berfungsi dengan baik, enzim nitrogenase membutuhkan unsur hara Mo (Armiadi, 2009).



Gambar 4. Nitrat Reduktase (Marschner, 2012)

Nitrat reduktase merupakan langkah pertama dalam asimilasi nitrat dan merupakan kunci utama untuk nutrisi tanaman. Walaupun kandungan unsur Mo

sangat kecil tetapi Mo merupakan bagian enzim nitrat reduktase, dimana akan mereduksi ion nitrat menjadi ion nitrit selanjutnya ion nitrit akan dikonversi menjadi amonium, melalui nitrit reduktase amonium dikonversi menjadi asam amino. Asam amino merupakan prekusor dalam pembentukan kurkuminoid. Sunarminingsih (2002) menyatakan bahwa biosintesis metabolit sekunder dapat terbentuk melalui jalur peptida dengan prekursor asam amino.

Karena molibdenum terlibat dengan kedua nitrat asimilasi dan fiksasi nitrogen, kekurangan molibdenum dapat menimbulkan kekurangan nitrogen jika nitrogen sumber terutama nitrat (Taiz dan Zieger, 2007). Kemungkinan gejala defisiensi Mo pada tanaman sangat bervariasi dan gejala yang sering timbul adalah klorosis atau daun berwarna kekuning-kuningan. Gejala kekurangan Mo hampir menyerupai kekurangan N. Kekurangan Mo dapat menghambat pertumbuhan tanaman, warna daun menjadi pucat dan mati (Armiadi, 2009). Tanaman umumnya cukup toleran dengan keracunan Mo, tetapi pada toksisitas Mo terjadi kegagalan pembentukan daun dan terjadi perubahan warna dari kehijauan menjadi kekuningan pada jaringan tunas (Marschner, 2012).

III. BAHAN DAN METODE

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian dilaksanakan pada bulan Mei sampai dengan Agustus 2014, di Laboratorium Kultur Jaringan Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya, Kota Malang dan Laboratorium Tanaman Obat Materia Medika, Kota Batu.

3.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian adalah *Laminar Air Flow Cabinet* (LAFC), *autoclave*, timbangan analitik, kompor listrik, botol kultur, pengaduk, gelas beker, pipet, pinset, cawan petri, *scalpel*, pH meter, panci, plastik penutup, karet gelang, *air conditioner* (AC), rak kultur, bunsen, kamera, *color chart Royal Horticultural Society* (RHS) dan *Thin Layer Chromatography* (TLC) *scanner Camag* untuk analisis kurkumin. Bahan yang digunakan sebagai eksplan adalah tunas rimpang temulawak, media dasar Murashige dan Skoog (MS), sukrosa 30 g/l, agar 7 g/l, zat pengatur tumbuh sitokinin 6-*Benzyl Amino Purine* (BAP), akuades steril, spitritus dan untuk sterilisasi eksplan adalah alkohol 96 %, fungisida benlate, bayclin (NaClO) 5,25 % dan antibiotik streptomycin sulfate. Bahan yang digunakan untuk analisis kurkumin adalah metanol PA (*Pro Analysis*), kloroform 99 %, etanol 96 % dan asam asetat glasial 96 %.

3.3 Metode Penelitian

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) dengan 3 kali ulangan. Pelakuan terdiri dari dua macam unsur hara mikro Cu dalam bentuk $CuSO_4.5H_2O$ dan Mo dalam bentuk $Na_2MoO_4.2H_2O$ pada empat taraf konsentrasi sehingga terdapat 8 perlakuan beserta perlakuan kontrol, yaitu :

1. T1 = Cu ($CuSO_4.5H_2O$) 0 ppm
2. T2 = Cu ($CuSO_4.5H_2O$) 0,25 ppm
3. T3 = Cu ($CuSO_4.5H_2O$) 0,5 ppm
4. T4 = Cu ($CuSO_4.5H_2O$) 0,75 ppm
5. T5 = Mo ($Na_2MoO_4.2H_2O$) 0 ppm
6. T6 = Mo ($Na_2MoO_4.2H_2O$) 0,25 ppm
7. T7 = Mo ($Na_2MoO_4.2H_2O$) 0,5 ppm
8. T8 = Mo ($Na_2MoO_4.2H_2O$) 0,75 ppm

3.4 Pelaksanaan Penelitian

3.4.1 Persiapan Alat

Sebelum dipergunakan alat-alat harus bersih dan steril. Alat yang disteril adalah pinset, scalpel, cawan petri dan botol kultur. Adapun tahapannya adalah alat-alat tersebut terlebih dahulu dicuci, lalu direndam menggunakan bayclin yang telah dilarutkan dengan air selama 24 jam. Setelah kering, alat-alat dibungkus dengan kertas, kemudian dimasukkan ke dalam autoclave dengan suhu 121ºC. Pada setiap aplikasi di dalam LAFC alat-alat tersebut disterilisasi dengan alkohol 96% dan dibakar dengan api bunsen.

3.4.2 Pembuatan Media

Media yang digunakan untuk isolasi eksplan adalah jenis media Murashige dan Skoog + 30 g/l sukrosa + 2 mg/l BAP. Selanjutnya, bahan-bahan tersebut diaduk sampai larut dan diukur pH-nya hingga mencapai pH 5,8. Sebagai pemadat media, ditambahkan agar 7 g/l kemudian media dipanaskan. Setelah media homogen, dituang ke dalam botol-botol kultur yang telah disterilkan masing-masing 20 ml setiap botolnya. Botol ditutup dengan plastik bening lalu dikencangkan hingga rapat dan disteril dalam autoclave selama 30 menit dengan suhu 121ºC dan tekanan 15 Psi. Sebelum digunakan, media disimpan terlebih dahulu minimal 3 hari untuk mengetahui apakah terjadi kontaminasi atau tidak.

3.4.3 Persiapan dan Sterilisasi Eksplan

Eksplan adalah bagian tanaman yang akan ditanam pada media kultur jaringan. Bahan eksplan yang digunakan adalah tunas rimpang temulawak. Rimpang temulawak diambil bagian tunasnya dan dicuci menggunakan detergen pada air mengalir. Setelah dicuci, tunas direndam di dalam larutan fungisida Benlate selama 30 menit dengan konsentrasi 3 gr/l. Kemudian tunas disterilkan menggunakan bayclin selama 15 menit dan dibilas dengan aquades steril sebanyak 3 kali. Setelah dibilas dengan aquades, tunas temulawak dikupas hingga bagian dalam, lalu direndam di dalam antibiotik

streptomycin sulfate selama 10 menit. Setelah selesai proses sterilisasi, eksplan siap untuk ditanam pada media kultur.

3.4.4 Penanaman Inokulasi

Eksplan yang telah steril diletakkan dalam cawan petri steril yang telah dilapisi kertas tissue steril untuk menyerap sisa streptomycin sulfate. Kemudian eksplan ditanam dalam media MS yang telah disiapkan. Eksplan yang telah ditanam dalam botol kultur diatur pada rak kultur yang dilengkapi dengan lampu TL 1000-4000 lux sebagai sumber cahaya.

3.4.5 Kadar Kurkumin

Pengukuran kadar kurkumin dengan menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Pemisahan kurkumin dilakukan dengan plat silika gel GF_{254} sebagai tempat penetesan ekstrak kurkumin dan larutan eluent kloroform, etanol 96 % dan asam asetat glasial 96 % dengan perbandingan 94 : 5: 1.

1. Pembuatan larutan standar

   Larutan standar yang digunakan adalah larutan kurkumin dengan konsentrasi 125 mg L^{-1}. 1,25 mg kurkumin standar dilarutkan pada 10 ml metanol.

2. Pembuatan ekstrak temulawak

   Planlet temulawak dikeringkan pada suhu 60º selama 2 x 24 jam, kemudian planlet kering ditumbuk sampai menjadi serbuk halus dengan menggunakan mortar keramik. Serbuk kering ditimbang 0,5 gram dan ditambahkan dengan metanol hingga terjadi perubahan warna dari hijau kekuningan menjadi bening. Ekstrak temulawak kemudian diuapkan sehingga diperoleh ekstrak kering dan setelah itu ditimbang berat ekstrak yang telah kering tersebut. Setelah itu dilakukan penambahan 10 ml metanol pada ekstrak yang telah kering tersebut.

3. Analisis kualitatif kurkumin

   Analisis kualitatif kurkumin menggunakan TLC-*scanner Camag* dilengkapi panjang sinar 430 nm. Pemisahan kurkumin dari larutan metanol menggunakan silika gel GF_{254} sebagai tempat diteteskan

larutan ekstrak sebanyak 8 µL menggunakan mikropipet. Pencampuran larutan eluent sebagai isi bejana pengembang adalah kloroform ; etanol 96 % : asam asetat glasial 96 % dengan perbandingan 96 : 5 :1 yang kemudian plat diletakan pada larutan tersebut. Langkah berikutnya adalah melihat tanda berwarna hijau kekuningan dari ekstrak yang telah diteteskan pada plat bergerak naik hingga mencapai bagian atas plat. Kemudian plat dikeluarkan dari bejana pengembang dan dikering anginkan.

4. Analisis kuantitatif kurkumin

   Tanda sampel ekstrak temulawak diukur luas areanya dengan alat TLC-*scanner Camag*, sehingga didapatkan nilai kurkumin dari 8 µL sampel yang diteteskan. Kemudian nilai tersebut dikonversikan dengan bobot kering planlet temulawak.

3.5 Variabel Pengamatan

Pengamatan dilakukan dengan dua cara yaitu tanpa merusak tanaman (non destruktif) dan merusak tanaman (destruktif). Pengamatan non destruktif meliputi:

1. Jumlah tunas, pengamatan dilakukan pada umur 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 dan 9 minggu setelah tanam. Tanaman disubkultur 1 kali pada umur 1 bulan.
2. Jumlah akar, pengamatan dilakukan pada umur 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 dan 9 minggu setelah tanam. Tanaman disubkultur 1 kali pada umur 1 bulan.
3. Jumlah daun, pengamatan dilakukan pada umur 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 dan 9 minggu setelah tanam. Tanaman disubkultur 1 kali pada umur 1 bulan.
4. Panjang tanaman pengamatan dilakukan pada umur 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 dan 9 minggu setelah tanam. Tanaman disubkultur 1 kali pada umur 1 bulan.
5. Warna daun, dibandingkan dengan *color chart* RHS (*Royal Horticultural Society*). Pengamatan dilakukan pada umur 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 dan 9 minggu setelah tanam.

Pengamatan destruktif meliputi:

1. Bobot segar dan kering planlet

   Pengamatan bobot segar dan bobot kering planlet dilakukan saat panen pada umur 9 minggu setelah tanam.
2. Kadar kurkumin pada temulawak

Pengamatan kadar kurkumin dilakukan saat panen pada umur 9 minggu setelah tanam. Pengamatan ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian beberapa konsentrasi perlakuan unsur hara mikro terhadap kandungan kurkumin temulawak.

3.6 Analisis Data

Analisis data statistik dengan menggunakan analisis varian (Anova). Pengujian dilakukan dengan menggunakan uji F pada taraf kesalahan 5%. Apabila terjadi perbedaan nyata antar perlakuan maka dilakukan uji lanjut dengan menggunakan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) pada taraf kesalahan 5%.