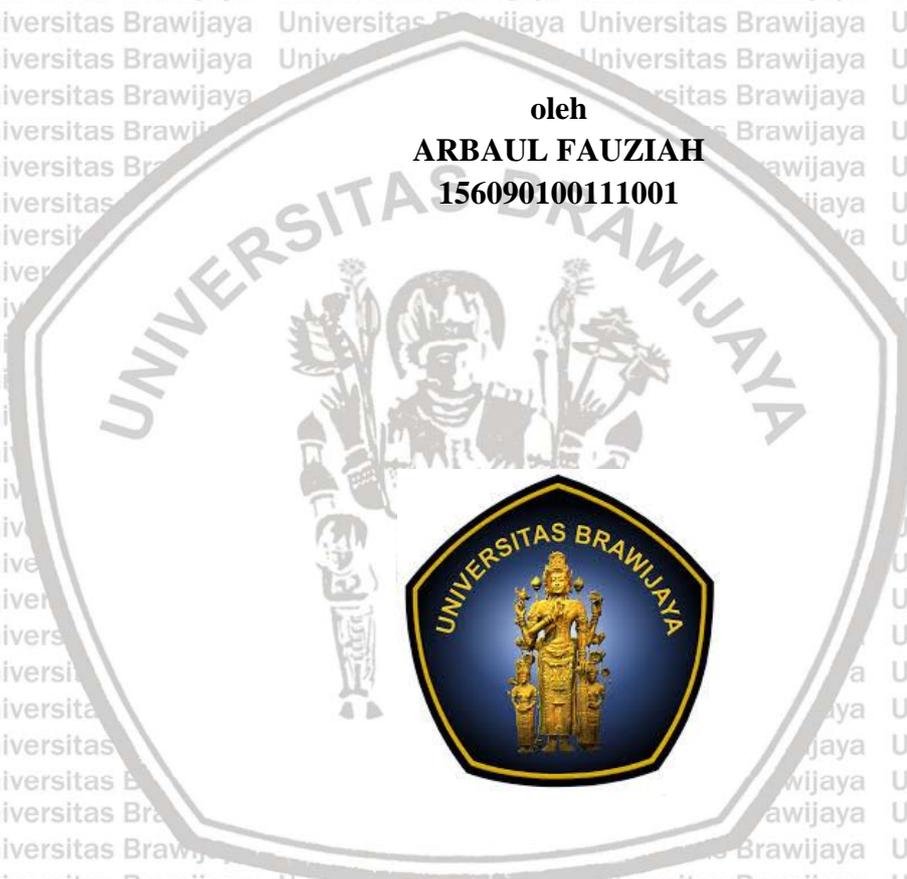


**PENINGKATAN KANDUNGAN VETIVER OIL PADA  
KULTUR KALUS AKAR WANGI (*Vetiveria zizanioides* (L.) Nash.)  
MELALUI ELISITASI DENGAN ION LOGAM (Cd, Al, Pb) DAN  
KARBOHIDRAT (PEKTIN, KITOSAN, ARABIC GUM)**

**TESIS**

oleh  
**ARBAUL FAUZIAH**  
**156090100111001**



**PROGRAM MAGISTER BIOLOGI  
JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**MALANG**

**2018**

**PENINGKATAN KANDUNGAN VETIVER OIL PADA  
KULTUR KALUS AKAR WANGI (*Vetiveria zizanioides* (L.) Nash.)  
MELALUI ELISITASI DENGAN ION LOGAM (Cd, Al, Pb) DAN  
KARBOHIDRAT (PEKTIN, KITOSAN, ARABIC GUM)**

**TESIS**

**Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Magister Sains dalam Bidang Biologi**

oleh  
**ARBAUL FAUZIAH**  
**156090100111001**



**PROGRAM MAGISTER BIOLOGI  
JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**MALANG**

**2018**

**HALAMAN PENGESAHAN TESIS**

**PENINGKATAN KANDUNGAN *VETIVER OIL* PADA  
KULTUR KALUS AKAR WANGI (*Vetiveria zizanioides* (L.) Nash.)  
MELALUI ELISITASI DENGAN ION LOGAM (Cd, Al, Pb) DAN  
KARBOHIDRAT (PEKTIN, KITOSAN, ARABIC GUM)**

**ARBAUL FAUZIAH  
156090100111001**

Telah dipertahankan di depan Majelis Penguji  
pada tanggal 27 Desember 2017  
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar  
Magister Sains dalam Bidang Biologi

Menyetujui

Pembimbing I

Dr. Wahyu Widoretno, M.Si  
NIP. 196304141989032001

Pembimbing II

Dr. Edi Priyo Utomo, MS  
NIP. 195712271986031003

Mengetahui

Ketua Program Studi Magister Biologi  
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

Nia Kurniawan, S.Si.,MP.,D.Sc  
NIP. 197810252003121002

## SUSUNAN KOMISI PEMBIMBING DAN PENGUJI TESIS

Judul Tesis:

**PENINGKATAN KANDUNGAN *VETIVER OIL* PADA KULTUR KALUS AKAR WANGI (*Vetiveria zizanioides* (L.) Nash.) MELALUI ELISITASI DENGAN ION LOGAM (Cd, Al, Pb) DAN KARBOHIDRAT (PEKTIN, KITOSAN, ARABIC GUM)**

Nama : Arbaul Fauziah

NIM : 156090100111001

### KOMISI PEMBIMBING :

Ketua : Dr. Wahyu Widoretno, M.Si

Anggota : Dr. Edi Priyo Utomo, M.S

### TIM DOSEN PENGUJI :

Dosen Penguji I : Ir. Retno Mastuti, M. Agr.Sc., DAggr.Sc

Dosen Penguji II : Dr. Serafinah Indriyani, M. Si

Tanggal Ujian : 27 Desember 2017

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



**HALAMAN PERNYATAAN ORISINILITAS TESIS**

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya, di dalam Naskah Tesis ini tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik di suatu Perguruan Tinggi, dan tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila ternyata di dalam Naskah Tesis ini dapat dibuktikan terdapat unsur-unsur jiplakan, saya bersedia Tesis (MAGISTER) dibatalkan, serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku (UU No. 20 Tahun 2003, pasal 2 dan pasal 70).

Malang, 17 Januari 2018

Arbaul Fauziah

156090100111001

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

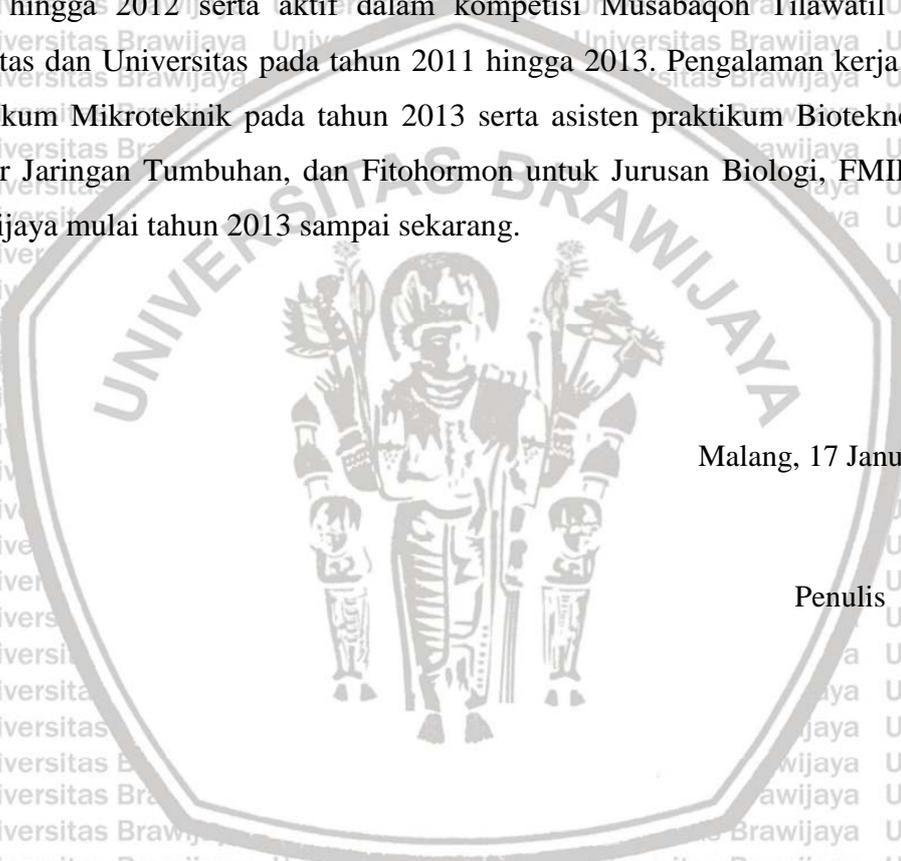


## RIWAYAT HIDUP

Arbaul Fauziah, Nganjuk, 10 Mei 1991 anak dari ayah Drs. H. A. Malik Bahri, M.Ag dan ibu Umi Kulsum, SD sampai SMA di Kabupaten Nganjuk, lulus SMA tahun 2010, kemudian melanjutkan studi di Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang mulai tahun 2010 dan menyelesaikan studi pada tahun 2014 dengan tugas akhir berjudul “Induksi Bawang Putih (*Allium Sativum* L.) Tetraploid secara *In Vitro* dengan Kolkisin”. Pengalaman organisasi sebagai anggota Divisi Keilmuan Himpunan Mahasiswa Biologi, FMIPA, Universitas Brawijaya tahun 2011 hingga 2012 serta aktif dalam kompetisi Musabaqoh Tilawatil Qur’an tingkat Fakultas dan Universitas pada tahun 2011 hingga 2013. Pengalaman kerja sebagai asisten praktikum Mikroteknik pada tahun 2013 serta asisten praktikum Bioteknologi Tanaman, Kultur Jaringan Tumbuhan, dan Fitohormon untuk Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Brawijaya mulai tahun 2013 sampai sekarang.

Malang, 17 Januari 2018

Penulis



## PEDOMAN PENGGUNAAN TESIS

Tesis ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar Pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipan hanya dapat dilakukan seizin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.





## RINGKASAN

**Peningkatan Kandungan *Vetiver Oil* pada Kalus Akar Wangi (*Vetiveria zizanioides* (L.) Nash.) melalui Elisitasi dengan Ion Logam (Cd, Al, Pb) dan Karbohidrat (Pektin, Kitosan, Arabic Gum)**

Arbaul Fauziah, Wahyu Widoretno, Edi Priyo Utomo  
Program Magister Biologi, Jurusan Biologi,  
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya  
2018

*Vetiver oil* (minyak akar wangi) mempunyai banyak manfaat, antara lain sebagai fiksatif dalam industri parfum, komponen campuran sabun dan kosmetik, serta aromaterapi. Kebutuhan *vetiver oil* dunia semakin meningkat seiring dengan perkembangan industri parfum, sabun, kosmetik, dan aromaterapi, yaitu mencapai 300-630 ton per tahun. Namun, Indonesia hanya mampu memenuhi sekitar 20 % dari kebutuhan *vetiver oil* dunia. Oleh sebab itu, perlu dilakukan upaya untuk peningkatan produksi *vetiver oil*. Senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan secara alami dari tanaman jumlahnya terbatas. Hal ini dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain metabolit sekunder pada tanaman *in vivo* disintesis dalam jumlah kecil dan hanya dapat diproduksi pada waktu tertentu sesuai musim.

Saat ini, teknik kultur mempunyai potensi yang menjanjikan sebagai metode alternatif untuk produksi metabolit sekunder. Melalui teknik kultur, metabolit sekunder dapat diproduksi secara kontinyu, dilakukan pada lingkungan terkontrol, dan dapat dimanipulasi untuk memperoleh hasil yang optimal. Beberapa metabolit sekunder seperti saponin, ginsenosida, dan kurkumin telah diproduksi pada skala industri menggunakan teknik kultur. Metabolit sekunder dalam kultur dapat ditingkatkan melalui pemberian prekursor ataupun elisitor. Elisitor yang ditambahkan pada medium kultur dapat berupa elisitor abiotik seperti ion logam maupun elisitor biotik seperti karbohidrat.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui dan mengevaluasi pengaruh jenis eksplan dan konsentrasi kinetin terhadap induksi dan pertumbuhan kalus akar wangi, pengaruh elisitor ion logam dan karbohidrat pada medium kultur terhadap pertumbuhan, jumlah komponen, dan kandungan *vetiver oil* pada kalus akar wangi, serta hubungan antara pertumbuhan kalus dengan kandungan *vetiver oil* pada kalus akar wangi. Penelitian menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) dengan ulangan sebagai kelompok dan menggunakan satu faktor, yaitu jenis elisitor ion logam Cd, Al, Pb atau karbohidrat berupa pektin, kitosan, arabic gum. Setiap perlakuan diulang sebanyak sepuluh kali (sepuluh botol) dan setiap botol terdiri dari 0,2 g kalus.

Penelitian ini dilakukan melalui beberapa tahapan, yaitu induksi dan multiplikasi kalus akar wangi, elisitasi kalus akar wangi dengan ion logam dan karbohidrat, ekstraksi *vetiver oil* dari kalus akar wangi, serta analisis komponen kimia *vetiver oil* dengan KLT dan GC-MS. Induksi kalus dilakukan dengan cara eksplan *crown* dan tiler akar wangi dikulturkan pada medium MS+2,4-D 0,75 ppm+ kinetin (0; 0,3; 0,5; 0,75; dan 1) ppm pada suhu 25-26 °C dengan intensitas cahaya 600 lux selama delapan minggu. Setiap delapan minggu sekali kalus disubkultur pada media MS+2,4-D 0,75 ppm+ kinetin 0,5 ppm dan kondisi yang sama dengan induksi kalus. Elisitasi dilakukan dengan cara kalus dikulturkan pada media MS dengan penambahan 2,4-D 0,75 ppm dan kinetin 0,5 ppm serta ion logam atau karbohidrat selama delapan minggu. Ion logam yang ditambahkan berupa Cd, Al, dan

Pb dengan konsentrasi 0,1 mM, sedangkan karbohidrat yang ditambahkan adalah pektin, kitosan, dan arabic gum dengan konsentrasi 100 ppm. Sebagai kontrol, kalus dikulturkan pada media MS+2,4-D 0,5 ppm+ kinetin 0,5 ppm dan tanpa elisitor. Kalus hasil elisitasi umur delapan minggu diamati pertumbuhannya, dihitung kadar air total dan kadar air sisa, serta dianalisis komponen kimia *vetiver oil*nya. Evaluasi pertumbuhan yang dilakukan meliputi kemampuan hidup kalus, morfologi kalus, dan biomassa kalus. Analisis kadar dan komponen kimia diawali dengan isolasi *vetiver oil* dari kalus tanaman akar wangi dengan metode ekstraksi menggunakan pelarut n-heksana. Ekstrak *vetiver oil* yang diperoleh kemudian dianalisis menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan *Gas Chromatography - Mass Spectrometry* (GC-MS). Melalui KLT, maka dapat diketahui keberadaan *vetiver oil* dalam kalus, sedangkan melalui metode GC-MS maka akan diperoleh informasi tentang jenis, jumlah, dan kadar masing-masing komponen kimia yang terkandung dalam *vetiver oil*. Data biomassa kalus, serta jumlah komponen kimia dan kadar *vetiver oil* dianalisis menggunakan ANOVA pada tingkat signifikansi 95%. Jika terdapat beda nyata maka diuji lanjutan menggunakan uji Duncan.

Pembentukan dan pertumbuhan kalus akar wangi dipengaruhi oleh jenis eksplan yang digunakan untuk inisiasi kultur. Eksplan tiler dapat menginduksi kalus lebih cepat dan menghasilkan pertumbuhan kalus yang lebih baik dibandingkan dengan pembentukan dan pertumbuhan kalus dari eksplan *crown*. Kalus terbentuk dari eksplan tiler mulai umur satu minggu setelah kultur, sedangkan kalus dari eksplan *crown* baru mulai terbentuk setelah umur empat minggu kultur. Pada umur kultur delapan minggu, berat basah kalus dari eksplan tiler sebesar 0,35 g, sedangkan berat basah kalus dari eksplan *crown* hanya sebesar 0,16 g. Penambahan kinetin dengan konsentrasi 0,5 ppm dalam medium menghasilkan berat basah paling tinggi dibandingkan dengan konsentrasi lainnya, yaitu sebesar 0,32 g. Penambahan elisitor ion logam atau karbohidrat dalam medium kultur menghambat pertumbuhan kalus. Pada elisitasi dengan ion logam, Cd menghambat pertumbuhan kalus lebih besar dibandingkan dengan ion logam Al dan Pb, sedangkan penghambatan pertumbuhan kalus terbesar pada elisitasi dengan karbohidrat terdapat pada kalus yang dielisitasi dengan pektin. Kultur kalus dari tanaman akar wangi mampu menghasilkan *vetiver oil* berupa vetiverol dan vanilin. Penambahan elisitor ion logam atau karbohidrat dalam medium kultur berpengaruh terhadap jumlah komponen dan kandungan *vetiver oil* dari kultur kalus akar wangi. Pada elisitasi dengan ion logam, jumlah komponen *vetiver oil* terbanyak terdapat pada kalus hasil elisitasi dengan ion logam Cd, yaitu ada tiga komponen, sedangkan jumlah komponen *vetiver oil* paling sedikit terdapat pada kalus hasil elisitasi dengan ion logam Pb. Namun kalus hasil elisitasi dengan ion logam Pb mampu menghasilkan kandungan vetiverol tertinggi dibandingkan dengan kontrol dan perlakuan elisitasi lainnya, yaitu 4,37%. Pemberian ion logam Cd pada medium kultur mampu memacu munculnya komponen kimia *vetiver oil* berupa alpha sinensal dan alpha amorphene, masing-masing sebesar 0,51 dan 0,17%. Kalus hasil elisitasi dengan karbohidrat mampu meningkatkan kandungan vanilin dan kandungan vanilin tertinggi terdapat pada kalus hasil elisitasi dengan pektin. Jumlah komponen dan kandungan *vetiver oil* tidak berkorelasi dengan pertumbuhan kalus dari tanaman akar wangi.

## SUMMARY

**The Enhanced Contents of Vetiver Oil of Callus Culture in Vetiver (*Vetiveria zizanioides* (L.) Nash.) Through Elicitation with Metal Ions (Cd, Al, Pb) and Carbohydrates (Pectin, Chitosan, Arabic Gum)**

Arbaul Fauziah, Wahyu Widoretno, Edi Priyo Utomo  
Master Program of Biology, Biology Department,  
Faculty of Sciences, Brawijaya University  
2018

Vetiver oil has many benefits, among others, as a fixative in the perfume industry, component mixture of soap and cosmetics, and aromatherapy. The need of *vetiver oil* in the world increase along with development the industry of perfumes, soaps, cosmetics, and aromatherapy, which reaches 300-630 tons in a year. However, Indonesia is only able to produce about 20 % of the need of *vetiver oil* in the world. Therefore, efforts should be carried out to increase the production of *vetiver oil*. Naturally, the production of bioactive compounds from the plant is limited. It is influenced by several factors, as bioactive compounds in intact plants are synthesized in a little amount and only produced at a certain time according to the seasons.

Recently, cell culture techniques are potential promising alternative method for the production of bioactive compounds. Through culture techniques, bioactive compounds can be produced continuously, conducted in a controlled environment, and can be manipulated to obtain optimal results. Some bioactive compounds such as saponins, ginsenoside, and curcumin have been produced on industrial scale using this cell culture techniques. Bioactive compounds in cell cultures can be enhanced by addition of precursors or elicitor. Elicitors added to the culture are either abiotic elicitor, such as metal ions, or biotic elicitor, such as carbohydrates.

The objective of this research are to figure out and evaluate the effect of explant types and kinetin concentration in callus induction, the effect of metal ions and carbohydrate elicitor added in the culture medium on the growth of vetiver callus, the chemical compounds of vetiver oil in vetiver callus, and the relationship between the growth of callus with the chemical compounds of vetiver oil in vetiver callus. The research use Randomized Block Design (RBD), the replication as a group and use one factor, which is the type of metal ion elicitor Cd, Al, Pb and carbohydrates in the form of pectin, chitosan, arabic gum. Each treatment is repeated ten times (ten bottles), and each bottle contains 0,2 g callus.

This research was conducted through several steps, those were induction and multiplication of vetiver callus, elicitation of vetiver callus with metal ions and polysacharida, isolation of vetiver oil, the analysis of the contents and chemical components of vetiver oil. Callus induction was conducted by culturing crown and tiller explants of vetiver in MS medium containing 0,75 ppm 2,4-D and kinetin (0; 0,3; 0,5; 0,75; and 1) ppm at 25-26 °C and 600 lux light intensity for eight weeks. Every eight weeks, callus was subcultured in the MS+2,4-D 0,75 ppm+ kinetin 0,5 ppm and the same conditions as callus. For elicitation, callus was cultured on MS+2,4-D 0,75 ppm+ kinetin 0,5 ppm supplemented with metal ion or polysacharida for eight weeks. The metal ions were 0,1 mM of Cd, Al, and Pb, whereas carbohydrates a were 100 ppm of pectin, chitosan and Arabic gum. For control, callus was cultured on medium MS + 2,4-D 0,75 ppm+

kinetin 0,5 ppm and without elicitor. The growth of callus from elicitation treatment was observed at 8<sup>th</sup> week, the total and residu of water are calculated, and the contents and chemical components of the vetiver oil are analyzed. The evaluation of growth consists of viability, morphology, and biomass of callus. The first step of vetiver oil contents and chemical components analysis was vetiver oil isolation from vetiver callus by extraction method using n-hexane. Vetiver oil extracts were analyzed using Gas Chromatography - Mass Spectrometry (GC-MS). By GC-MS method, information about the type, amount, and concentration of each chemical component contained in vetiver oil will be obtained.

Formation and growth of callus in vetiver were influenced by type of explants used for culture initiation and concentraion of kinetin supplemented in the medium. Callus formation from tiller explant were faster and the callus growth were also better than callus formation and callus growth from crown explant. Callus from tiller explant started to form a week after culture, while callus from crown explant were formed four weeks after culture. At 8 weeks after culture, the callus fresh weight from tiller explant was 0,35 g, while the fresh weight callus from crown explant was only 0,16 g. The addition of 0,5 ppm kinetin in the medium produced the highest callus fresh weight than the other treatments, it was 0,32 g. The callus growth in vetiver also was influenced by addition of metal ion (Cd, Al, dan Pb) or carbohydrates elicitor in the medium. The addition of metal ion or polysacarida elicitor inhibited callus growth. In elicitation with metal ions, Cd inhibited callus growth greater than Al and Pb, whereas the largest of callus growth in elicitation with carbohydrates a was detected on callus elicited by pectin. Callus was cultured from vetiver able to produce vetiver oil, they were vetiverol and vanillin. The addition of metal ion or carobohydrate elicitor in the culture medium affected the number of components and the vetiver oil content of vetiver culture. In elicitation with metal ions, the highest number of vetiver oil components was found in callus-elicited with Cd metal ion, there were three components, while the least number of vetiver oil components was on callus -elicited with Pb metal ion. However, elicitation callus with Pb metal ion was able to produce the highest vetiverol content compared with control and other elicitation treatments, that was 4,37%. The suplemented of Cd metal ion on the culture medium can promote the appear of vetiver oil chemical components such as alpha sinensal and alpha amorphene, each of 0,51 and 0,17%. Callus elicitation with carbohydrates can increase the content of vanillin and the highest vanilin content was found in callus-elicited with pectin. The number of components and the content of vetiver oil were not correlated with the of vetiver callus growth.

## KATA PENGANTAR

Alhamdulillah Rabbil 'Alamiin dengan ungkapan rasa syukur pada Allah Yang Maha Kuasa akhirnya penulis dapat menyelesaikan penyusunan tesis dalam Bidang Biologi di Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang.

Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

1. Ibu Dr. Wahyu Widoretno, M.Si selaku Dosen Pembimbing I dan Bapak Dr. Edi Priyo Utomo, M.S. selaku Dosen Pembimbing II yang telah mendampingi dan memberi pengarahan, saran, dan tambahan ilmu yang berguna bagi penulis.
2. Ibu Ir. Retno Mastuti, M.Agr.Sc., D.Agr.Sc. selaku Dosen Penguji I dan Ibu Dr. Serafinah Indriyani, M.Si. selaku Dosen Penguji II yang telah memberi saran yang bermanfaat demi perbaikan penyusunan tesis.
3. Bapak Nia Kurniawan, S.Si., MP., D.Sc. selaku Ketua Program Studi Pascasarjana Biologi yang telah memberi saran yang bermanfaat demi perbaikan penyusunan tesis.
4. Ibu, kakak, dan keponakan tercinta atas segala doa dukungan dan motivasi yang tidak terkira. Almarhum ayah, nenek, dan kakek tercinta yang senantiasa menjadi inspirator.
5. Rekan- rekan laboratorium FKM, rekan-rekan Pascasarjana Biologi angkatan 2015 dan seluruh civitas akademik Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Brawijaya Malang.

Penulisan tesis ini merupakan upaya optimal penulis sebagai sarana terbaik dalam pengembangan ilmu pengetahuan. Saran dan kritik yang membangun sangat diharapkan untuk menjadikan karya ini semakin bermanfaat.

Malang, 17 Januari 2018

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
<b>RINGKASAN</b> .....	i
<b>SUMMARY</b> .....	iii
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	v
<b>DAFTAR ISI</b> .....	vi
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	viii
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	ix
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	x
<b>BAB I PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan.....	4
1.4 Manfaat.....	4
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Minyak Atsiri Akar Wangi.....	5
2.2 Manfaat dan Komponen Kimia Minyak Atsiri Akar Wangi.....	7
2.3 Biosintesis Minyak Atsiri.....	10
2.4 Potensi Teknik Kultur Sel untuk Produksi Metabolit Sekunder.....	14
2.5 Elisitasi dalam Peningkatan Metabolit Sekunder.....	16
2.6 Isolasi dan Identifikasi Komponen Kimia Minyak Atsiri.....	17
2.7 Kerangka Konsep Penelitian.....	21
<b>BAB III METODE PENELITIAN</b>	
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	23
3.2 Kerangka Operasional Penelitian.....	23
3.3 Tahapan Penelitian.....	25
3.3.1 Induksi Kalus dan Multiplikasi Kalus Akar Wangi.....	25
3.3.2 Elisitasi Kalus Akar Wangi dengan Ion Logam dan Karbohidrat.....	26
3.3.3 Isolasi <i>Vetiver Oil</i> Kalus Akar Wangi.....	26
3.3.4 Analisis Kadar dan Komponen Kimia <i>Vetiver Oil</i> Kalus Akar Wangi dengan metode <i>Gas Chromatography - Mass Spectrometry</i> (GC-MS).....	27
3.4 Rancangan Penelitian.....	27
3.5 Analisis Data.....	28
<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN</b>	
4.1 Pengaruh Jenis Eksplan dan Konsentrasi Kinetin terhadap Induksi dan Pertumbuhan Kalus dari Tanaman Akar Wangi.....	29
4.2. Pengaruh Pemberian Elisitor Ion Logam (Cd, Al, Pb) dan Karbohidrat (Pektin, Kitosan, Arabic Gum) pada Medium Kultur terhadap Pertumbuhan Kalus dari Tanaman Akar Wangi.....	32
4.3. Pengaruh Pemberian Elisitor Ion Logam (Cd, Al, Pb) dan Karbohidrat (Pektin, Kitosan, Arabic Gum) pada Medium Kultur terhadap Kandungan <i>Vetiver Oil</i> Kalus dari Tanaman Akar Wangi.....	34

4.4. Korelasi antara Pertumbuhan Kalus dengan Kandungan *Vetiver Oil*  
Kalus dari tanaman Akar Wangi..... 43

**BAB V PENUTUP**

5.1. Kesimpulan..... 47  
5.2. Saran..... 47

**DAFTAR PUSTAKA**..... 49

**LAMPIRAN**..... 57



DAFTAR TABEL

Nomor		Halaman
4.1	Komponen kimia hasil analisis GC-MS dari ekstrak(n-heksana) kalus kontrol dan hasil elisitasi dengan ion logam.....	38
4.2	Kandungan <i>vetiver oil</i> kalus hasil elisitasi dengan ion logam Pb, Al, Cd 0,1mM umur 8 minggu.....	38
4.3	Komponen kimia hasil analisis GC-MS dari ekstrak(n-heksana) kalus kontrol dan hasil elisitasi dengan karbohidrat .....	41
4.4	Kandungan <i>vetiver oil</i> kalus hasil elisitasi dengan karbohidrat 100 ppm umur 8 minggu .....	42



DAFTAR GAMBAR

Nomor		Halaman
2.1	Struktur kimia <i>vetiver oil</i> dari berbagai golongan.....	9
2.2	Biosintesis terpenoid melalui jalur asam mevalonat.....	12
2.3	Biosintesis korismat melalui jalur fenil propanoid.....	13
2.4	Pembentukan senyawa aromatik dari korismat.....	14
2.5	Mekanisme umum kerja elisitor pada sel.....	16
2.6	Kromatogram minyak akar wangi dari Garut .....	20
2.7	Kerangka konsep penelitian.....	22
3.1	Kerangka operasional penelitian.....	24
3.2	Pengambilan eksplan dari tanaman akar wangi.....	25
4.1	Pembentukan dan pertumbuhan kalus dari eksplan <i>crown</i> dan eksplan tiler pada medium MS dengan penambahan kombinasi 2,4-D 0,75 ppm dan beberapa konsentrasi kinetin.....	29
4.2	Pengaruh jenis eksplan pada berat basah kalus dari tanaman akar wangi umur 8 minggu setelah kultur.....	30
4.3	Pengaruh konsentrasi kinetin yang dikombinasikan dengan 2,4-D 0,75 ppm pada medium terhadap berat basah kalus umur 8 minggu setelah kultur.....	30
4.4	Pertumbuhan kalus akar wangi umur delapan minggu setelah dielisitasi dengan ion logam 0.1 mM dan karbohidrat 100 ppm.....	32
4.5	Berat basah dan berat kering kalus akar wangi umur delapan minggu setelah elisitasi.....	33
4.6	Rendemen <i>vetiver oil</i> kalus akar wangi hasil perlakuan elisitasi dengan ion logam dan karbohidrat.....	34
4.7	KLT dari ekstrak <i>vetiver oil</i> pada kalus akar wangi hasil elisitasi dengan ion logam delapan minggu setelah kultur.....	35
4.8	Kromatogram GC-MS <i>vetiver oil</i> yang diperoleh dari kalus akar wangi hasil perlakuan elisitasi dengan ion logam.....	37
4.9	Kromatogram GC-MS <i>vetiver oil</i> yang diperoleh dari kalus akar wangi hasil perlakuan elisitasi dengan karbohidrat.....	40
4.10	Korelasi antara berat kering dengan jumlah komponen <i>vetiver oil</i> pada kalus hasil elisitasi dengan ion logam dan karbohidrat.....	44
4.11	Korelasi antara berat kering dengan kandungan <i>vetiver oil</i> pada kalus hasil elisitasi dengan ion logam dan karbohidrat.....	44

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor		Halaman
1	Analisis Statistik .....	57
2	Perhitungan Rendemen Ekstrak .....	67
3	Kromatogram GC-MS Kalus Hasil Elisitasi dengan Ion Logam.....	71
4	Kromatogram GC-MS Kalus Hasil Elisitasi dengan Karbohidrat.....	75
5	Sertifikat Bebas Plagiasi.....	78





## BAB I PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

*Vetiver oil* merupakan minyak atsiri yang dihasilkan dari tanaman akar wangi (*Vetiveria zizanioides* (L.) Nash.). *Vetiver oil* mempunyai banyak manfaat, antara lain sebagai fiksatif dalam industri parfum, komponen campuran dalam industri sabun dan kosmetik, serta aromaterapi. Pemanfaatan *vetiver oil* dalam berbagai industri tersebut disebabkan adanya komponen kimia *vetiver oil*, yaitu vetiverol, vetivone, khusimone, khusimol, vetivene, khusitone, terpenes, benzoic acid, triterpene-4-ol,  $\beta$ -humulene, epizizianal, vetivenyl vetivenate, iso khusimol,  $\beta$ -vetivone, dan vetivazulene (Inggrid dkk., 2010).

Kebutuhan *vetiver oil* semakin meningkat seiring dengan perkembangan industri parfum, kosmetik, dan aromaterapi. Selain itu, peningkatan kebutuhan *vetiver oil* juga disebabkan oleh posisi *vetiver oil* di dunia. Saat ini, *vetiver oil* telah dijadikan dan dikembangkan sebagai komoditas ekspor yang memasuki pasar internasional. Faktor lain yang menyebabkan tingginya permintaan *vetiver oil* dunia adalah menurunnya pasokan minyak akar wangi dari Haiti yaitu salah satu negara pemasok *vetiver oil* di dunia. Hal ini terjadi akibat gangguan lingkungan dan masalah sosial pasca tsunami tahun 2010. Berdasarkan hal tersebut, maka kebutuhan *vetiver oil* dunia semakin meningkat, yaitu mencapai 300-630 ton per tahun. Namun, Indonesia hanya mampu memenuhi sekitar 20 % dari kebutuhan *vetiver oil* tersebut dengan rata-rata produksi *vetiver oil* sebesar 25-30 ton per tahun (Zulmunir, 2010).

Rendahnya produksi *vetiver oil* disebabkan oleh lamanya masa tumbuh akar wangi sebagai tanaman penghasil minyak atsiri, yaitu mencapai umur 14-16 bulan. Selain itu, syarat lokasi tumbuh akar wangi yang berada pada tanah berpasir atau daerah aliran abu gunung berapi pada lereng-lereng bukit menyebabkan akar wangi hanya cocok ditanam pada beberapa lokasi tertentu di Indonesia. Salah satu daerah di Indonesia yang merupakan daerah sentra produksi tanaman akar wangi adalah Kabupaten Garut, Jawa Barat (Inggrid dkk., 2010). Kandungan *vetiver oil* yang berasal dari Garut lebih unggul dibandingkan dengan daerah lain di Indonesia (Rahmawati, 2010). Selain dari faktor lingkungan, produksi *vetiver oil* yang rendah disebabkan oleh rendemen minyak akar wangi yang dihasilkan masih kurang memenuhi standar bahan baku, yaitu sekitar 1,2% dari potensi minyak yang harusnya mencapai 2-3% dan kadar vetiverolnya kurang dari 50% (Zulmunir, 2010).

Rendahnya kualitas *vetiver oil* ini merupakan akumulasi dari kualitas bahan baku tanaman atsiri yang rendah dan tidak seragam.

Peningkatan produksi dan kualitas *vetiver oil* pada tanaman akar wangi dapat dilakukan melalui beberapa cara, yaitu perluasan lahan tanam, perbaikan kondisi lingkungan tanam, dan penerapan bioteknologi modern. Salah satu bioteknologi modern yang dapat digunakan untuk meningkatkan produksi dan kualitas *vetiver oil* yaitu melalui teknik kultur (Saraswathi, 2011).

Teknik kultur merupakan salah satu metode yang dapat digunakan untuk meningkatkan metabolit sekunder dalam tanaman. Melalui teknik kultur, metabolit sekunder dapat diproduksi secara kontinyu, dilakukan pada lingkungan terkontrol, dan dapat dimanipulasi untuk memperoleh hasil yang optimal (Wetter & Constabel, 1991). Saat ini teknik kultur telah digunakan untuk produksi metabolit sekunder skala industri pada beberapa tanaman, seperti kuinolin dari tanaman kina (*Cinchona ledgeriana* dan *Cinchona Succirubra*) (Sumaryono dkk., 2009), kurkumin dari kunyit (*Curcuma longa*) dan temulawak (*Curcuma xanthoriza*) (Kristina dkk., 2010), serta saponin dari tanaman ginseng Jawa (*Talinum paiculatum* Gaertn.) (Robi'ah, 2013).

Peningkatan senyawa bioaktif melalui teknik kultur dapat dilakukan melalui beberapa cara, yaitu kultur kalus, suspensi sel, dan *hairy root culture*. Penggunaan kultur kalus dalam peningkatan metabolit sekunder diawali dengan induksi kalus. Keberhasilan induksi kalus dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain jenis eksplan dan zat pengatur tumbuh. Zat pengatur tumbuh 2,4-D dan kinetin merupakan zat pengatur tumbuh yang sering digunakan untuk induksi kalus. Penggunaan 2,4-D dan kinetin untuk induksi kalus akar wangi telah dilakukan pada ekplan basal batang (Esyanti dkk., 2013), *shoot tip* (Amali dkk., 2014), dan *axillary bud* (Sompornpailin dkk., 2016).

Penggunaan kultur kalus dalam peningkatan metabolit sekunder telah dilakukan pada beberapa tanaman. Senyawa *quinone* kalus *Peritassa campestris* meningkat 5,55 kali (Paz, 2013) dan isoprenoid kalus *Artemisia annua* L. 2,5 kali lebih tinggi daripada senyawa yang dihasilkan dari tanaman utuh (Rizzello, 2014). Penggunaan teknik kultur juga mampu meningkatkan kadar *vetiver oil* akar wangi dengan kandungan terpenoid sebanyak 4,9% (Adams dkk., 2004).

Peningkatan kandungan metabolit sekunder melalui kultur kalus salah satunya dapat didukung dengan elisitasi. Elisitasi merupakan upaya peningkatan kandungan metabolit sekunder dengan penambahan elisitor pada medium kultur. Elisitor mengaktifkan gen dalam tumbuhan yang mengkode enzim yang diperlukan untuk sintesis metabolit sekunder.

Elisitor yang ditambahkan pada medium kultur dapat berupa elisitor abiotik maupun biotik. Elisitor abiotik berasal dari senyawa anorganik seperti etana, sinar UV, temperatur ekstrim, dan logam. Ion logam yang dapat digunakan sebagai elisitor antara lain  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$ , dan  $\text{Cr}^{2+}$  (Angelova dkk., 2006). Pemberian  $\text{AlCl}_3$  dan  $\text{CdCl}_2$  pada medium kultur mampu meningkatkan akumulasi kolkisin pada kultur akar *Gloriosa superba*, masing-masing sebesar 63 kali dan 5 kali lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol (Gosh dkk., 2006).

Elisitor biotik berasal dari bahan hayati yang meliputi karbohidrat, protein, lipid, glikoprotein, dan senyawa volatil (komposisi kompleks) atau fragmen-fragmen dinding sel yang berasal dari fungi, bakteri, dan tanaman. Elisitor biotik berupa karbohidrat antara lain sukrosa, alginat, *arabic gum*, pektin, kitosan, dan glukukan (Angelova dkk., 2006). Kandungan flavonoid dapat ditingkatkan melalui elisitasi dengan kitosan. Pemberian kitosan sebanyak 20 mg selama 24 jam pada medium kultur mampu meningkatkan sintesis flavonoid sebanyak 3,51 mg/g atau 2,72 kali lebih tinggi daripada kontrol (Mendhulkar & Vakil, 2013).

Identifikasi komponen kimia *veiver oil* dapat dilakukan melalui analisis Kromatografi Lapis Tipis (KLT), Kromatografi Gas-Spektrofotometer Massa (GC-MS), Spektrometer Infra Merah (IR), dan Resonansi Magnetik Inti (NMR). KLT merupakan salah satu analisis kualitatif yang sangat berguna untuk mengetahui jumlah senyawa dalam sampel berdasarkan perbedaan kepolaran, sehingga sering digunakan untuk identifikasi awal keberadaan suatu senyawa yang terkandung dalam campuran (Hendayana, 2010). Penggunaan metode GC-MS untuk identifikasi komponen kimia minyak atsiri telah dilakukan pada akar tanaman *Oplopanax horridus* (Shao, 2014) dan akar tanaman akar wangi (*Chrysopogon zizanioides* (L.) Roberty) (Kadarohman dkk., 2014). Hasil analisis GC-MS memberikan informasi tentang jumlah dan jenis komponen kimia yang terkandung dalam minyak atsiri. Pada penelitian ini, elisitasi pada kultur kalus dilakukan sebagai upaya untuk mengembangkan metode produksi minyak atsiri tanaman akar wangi.

## 1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah pada penelitian ini adalah:

1. Bagaimanakah pengaruh jenis eksplan dan konsentrasi kinetin terhadap induksi dan pertumbuhan kalus akar wangi?

2. Bagaimanakah pengaruh pemberian elisitor ion logam (Cd, Al, Pb) dan karbohidrat (pektin, kitosan, arabic gum) pada medium kultur terhadap pertumbuhan kalus akar wangi?
3. Bagaimanakah pengaruh pemberian elisitor ion logam (Cd, Al, Pb) dan karbohidrat (pektin, kitosan, arabic gum) pada medium kultur terhadap jumlah komponen dan kandungan *vetiver oil* kalus akar wangi?
4. Bagaimanakah korelasi antara pertumbuhan kalus dengan jumlah komponen dan kandungan *vetiver oil* akar wangi?

### 1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk:

1. Mengevaluasi pengaruh jenis eksplan dan konsentrasi kinetin terhadap induksi dan pertumbuhan kalus akar wangi
2. Mengetahui pengaruh pemberian elisitor ion logam (Cd, Al, Pb) dan karbohidrat (pektin, kitosan, arabic gum) pada medium kultur terhadap pertumbuhan kalus akar wangi
3. Mengetahui pengaruh pemberian elisitor ion logam (Cd, Al, Pb) dan karbohidrat (pektin, kitosan, arabic gum) pada medium kultur terhadap jumlah komponen dan kandungan *vetiver oil* kalus akar wangi
4. Mengetahui korelasi antara pertumbuhan kalus dengan jumlah komponen dan kandungan *vetiver oil* akar wangi

### 1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini adalah diperoleh metode pengembangan produksi minyak atsiri *vetiver oil* akar wangi melalui kultur kalus.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Minyak Atsiri Akar Wangi

Minyak atsiri merupakan minyak yang terdiri dari campuran berbagai macam senyawa yang sering digunakan dalam berbagai industri, seperti industri pafum, kosmetik, makanan, dan obat-obatan (Raharjo, 2013). Senyawa murni yang terkandung dalam minyak atsiri dapat digunakan untuk bahan aktif obat-obatan pada berbagai jenis penyakit, seperti radang selaput sendi, radang tenggorokan, sakit kepala, radang usus besar, jantung berdebar, dan sebagainya. Selain itu, minyak atsiri dapat digunakan untuk mengatasi iritasi arthritis dan rematik serta pelancar haid. Manfaat lain dari minyak atsiri adalah sebagai antibakteri dan antijamur (Agusta, 2000).

Minyak atsiri mempunyai aroma khas karena terdiri dari campuran berbagai senyawa, seperti fenilpropanoat dan terpenoid. Kelarutan minyak atsiri dalam air sangat rendah dan indeks refraksinya tinggi. Minyak atsiri mengandung komponen-komponen yang bersifat volatil (mudah menguap) sehingga menghasilkan aroma tertentu (Raharjo, 2013). Berbagai komponen minyak atsiri yang bersifat volatil tersebut dapat digunakan sebagai ciri khas atau sidik jari (*finger printing*) dari suatu jenis tanaman penghasil minyak atsiri. Oleh sebab itu, minyak atsiri dari berbagai jenis tanaman mempunyai aroma yang spesifik. Berbagai aroma yang mengandung komponen spesifik inilah yang dijadikan sebagai dasar pemanfaatan minyak atsiri, yaitu untuk pengharum tubuh, pengharum ruangan, sabun, pasta gigi, pemberi cita rasa pada makanan, dan sebagainya (Agusta, 2000). Salah satu tanaman yang memiliki kandungan minyak atsiri adalah akar wangi. Tanaman akar wangi termasuk keluarga *Gramineae*, berumpun lebat, dan memiliki akar-akar halus berwarna kuning pucat atau abu-abu sampai merah tua (Damanik, 2006). Akar tanaman akar wangi berupa sistem akar serabut rapat yang dalam, bercabang-cabang, memiliki rimpang, serta beraroma harum (Sell, 2003). Tanaman akar wangi lebih cocok ditanam di daerah panas karena tempat teduh memberikan pengaruh yang kurang baik terhadap perkembangan sistem akar (Guether, 2000). Akar wangi banyak dibudidayakan di berbagai negara beriklim tropis seperti India, Bangladesh, Srilangka, Myanmar, dan beberapa tempat di kawasan Asia Tenggara serta wilayah subtropis seperti Cina (Inggrid, dkk., 2010). Di India, tanaman akar wangi ini dikenal dengan sebutan “cus-cus” atau “khas-khas” yang artinya akar berbau wangi (Inggrid dkk., 2010).

Beberapa negara yang dikenal sebagai produsen minyak akar wangi yaitu Haiti, India, Cina dan Brazil, dan Indonesia. Akar wangi banyak dibudidayakan dengan tujuan diambil akarnya yang mengandung minyak (Hadipoentyanti, dkk., 2008). Minyak akar wangi Indonesia memiliki bobot jenis ( $15^{\circ}\text{C}$ ) sebesar 0.9926-1.0444, putaran optic ( $20^{\circ}\text{C}$ ) ( $46^{\circ}$ ), indeks bias ( $20^{\circ}\text{C}$ ) sebesar 1.5189-1.5306, bilangan asam 8.4-40.1, bilangan ester 5.6-24.6, bilangan ester setelah asetilasi 103.7-151.2, serta pada alcohol 80% larut dalam 1-2 volume dan kadang berubah warna sampai keruh dengan alcohol lebih banyak. Sedangkan minyak akar wangi asal Haiti memiliki bobot jenis ( $15^{\circ}\text{C}$ ) sebesar 0.999-1.014, putaran optic ( $22^{\circ}$ )-(31 $^{\circ}$ 44'), indeks bias ( $20^{\circ}\text{C}$ ) sebesar 1.5198-1.5250, bilangan asam 7.5-16.8, bilangan ester 8.4-52.3, bilangan ester setelah asetilasi 124-264, serta pada alcohol larut dalam 0.5 volume alcohol 90% (Mulyono, 2012). Berdasarkan SNI (2006), syarat mutu minyak akar wangi yang baik adalah berwarna kuning muda hingga coklat kemerahan khas akar wangi, memiliki bobot jenis ( $20^{\circ}\text{C}$ ) sebesar 0.980-1.003, indeks bias 1.520-1.530, kelarutan dalam etanol 95% adalah 1:1 jernih dan seterusnya jernih, bilangan asam 10-35, bilangan ester 5-26, bilangan ester setelah asetilasi 100-150, dan kandungan vetiverol minimal 50% (Sani, 2011).

Salah satu daerah di Indonesia yang merupakan daerah sentra produksi tanaman akar wangi adalah kabupaten Garut, Jawa Barat (Inggrid dkk., 2010). Hal ini disebabkan Garut merupakan daerah vulkanik yang cocok untuk pertumbuhan tanaman akar wangi (Rahmawati, 2010). Tanaman akar wangi di Jawa termasuk ke dalam varietas akar wangi yang tidak berbunga dengan jenis *Andropogon muricatus* Retz. Akar wangi kering dari Jawa yang berkualitas baik menghasilkan rendemen minyak 1.5-2%, sedangkan akar segar menghasilkan rendemen minyak yang lebih sedikit (Guether, 2000). Minyak atsiri yang terkandung dalam akar wangi sering disebut dengan *veiver oil*. *Vetiver oil* yang berasal dari daerah Jawa dikenal dengan sebutan *Java Vetiver* (Chahal dkk., 2015).

Minyak atsiri merupakan hasil utama dari tanaman akar wangi. Adanya kandungan minyak pada akar tanaman akar wangi menjadikan tanaman akar wangi memiliki nilai ekonomis yang tinggi (Sani, 2011). Minyak akar wangi sebagai salah satu komoditas ekspor minyak atsiri berperan penting bagi pendapatan devisa negara (Rusli dkk., 2009). Sebagian besar produksi minyak atsiri akar wangi Indonesia diekspor ke Singapura, berbagai wilayah di India, Jepang, Hongkong, Inggris, Belanda, Jerman, Italia, Swiss, dan Amerika Serikat. Peluang ekspor minyak akar wangi masih terbuka luas, terutama ke Asia Selatan, Asia Timur, Eropa Timur, dan Amerika Selatan. Terbukanya peluang ekspor yang masih luas karena tidak banyak negara kompetitor, selain Haiti dan Borbon (Bappebti,

2012). Namun demikian, posisi Indonesia di pasar akar wangi dunia relatif kecil. Hal ini disebabkan mutu minyak akar wangi Indonesia sering kurang sesuai dengan kebutuhan pasar. Dengan demikian, terdapat peluang untuk pengembangan industri akar wangi dalam negeri dengan harapan diperoleh akar wangi yang berkualitas tinggi. Minyak akar wangi yang berasal dari Indonesia dalam pasar internasional dikenal sebagai *Java vetiver oil* (Indrawanto, 2009).

## 2.2 Manfaat dan Komponen Kimia Minyak Atsiri Akar Wangi

Minyak akar wangi (*vetiver oil*) termasuk produk alami (*natural product*), dalam arti komponen senyawa kimia fungsional yang terkandung di dalamnya tidak dapat tergantikan oleh produk sintetis. Adanya komponen senyawa kimia fungsional pada *vetiver oil* ini menjadikan *vetiver oil* sering digunakan sebagai bahan baku berbagai industri, seperti bahan pewangi untuk pembuatan parfum, bahan kosmetik, dan bahan pewangi sabun (Sani, 2011). Pada industri parfum, minyak akar wangi umumnya digunakan sebagai fiksatif, sedangkan pada industri sabun dan kosmetik minyak akar wangi banyak digunakan sebagai komponen campuran (Ingrid dkk., 2010). Selain itu, minyak akar wangi juga dimanfaatkan untuk bahan obat-obatan, aromaterapi, serta dapat pula digunakan sebagai pembasmi dan pencegah serangga (Sabini, 2006). Menurut Rahmawati (2010), minyak atsiri dapat digunakan sebagai senyawa antimikroba dan insektisida alami. Minyak atsiri dari tanaman akar wangi menunjukkan aktivitas larvasida terhadap larva *Aedes aegypti*. Tanaman akar wangi dari India mengandung senyawa pada bagian akarnya yang dapat diaplikasikan sebagai antijamur, antioksidan, antikanker, anti-inflamasi, antibakteri, dan fungisida. Ekstrak minyak atsiri yang hangat dan berbau harum dari tanaman ini dilaporkan mampu meningkatkan cita rasa makanan dan telah digunakan sebagai aromaterapi untuk penderita cacat mental dan *antidiarheal* untuk anak-anak (Danha, 2009).

Minyak atsiri dari akar *V. zizanioides* yang berasal dari Italia secara luas telah digunakan sebagai bahan baku parfum, antibakteri, antijamur dan antiinsektisida, sedangkan minyak atsiri dari akar *V. nigriflora* Italia telah diaplikasikan sebagai bahan baku parfum dan antibakteri. Secara tradisional, minyak atsiri dari *V. zizanioides* Italia telah digunakan untuk meningkatkan rasa air minum dan menghilangkan bakteri patogen. *V. nigriflora* Italia berpotensi sebagai antidiarheal untuk anak-anak (Massardos dkk., 2005). Menurut Adams dkk. (2004), senyawa eremophilane dan eudesmane yang telah diisolasi dari *V. zizanioides* Haiti berperan penting dalam aplikasi antimikroba. Selain itu, salah satu

senyawa kimia dari *V. zizanioides* Haiti yang berhasil diidentifikasi dari golongan siskuitergen adalah nootkatone. Senyawa ini bersifat toksik sebagai pembasmi rayap, kecoa, dan semut merah. Senyawa nootkatone dapat digunakan sebagai pestisida ramah lingkungan serta mampu menghambat perkecambahan dan pertumbuhan beberapa spesies gulma (Henderson dkk., 2006).

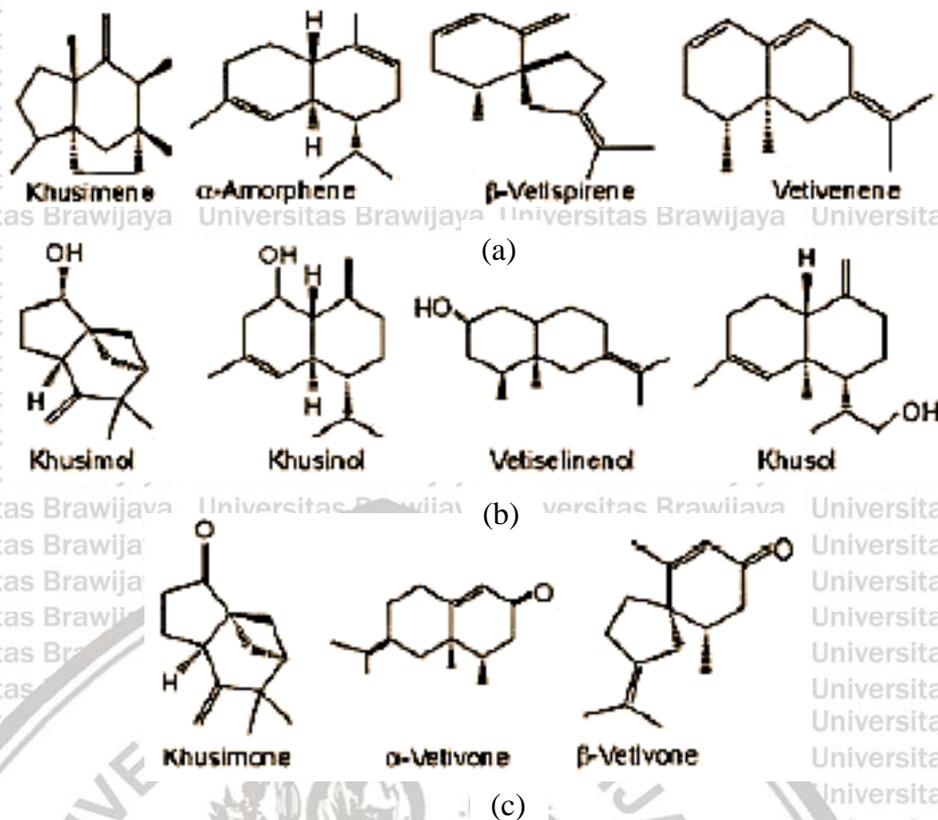
Minyak atsiri akar wangi merupakan salah satu bahan pewangi yang potensial. Pemanfaatan minyak akar wangi sebagai bahan baku industri karena minyak atsiri akar wangi memberikan bau wangi menyenangkan, tahan lama, dan keras. Karena bau minyak akar wangi yang keras maka dalam penggunaannya sering dikombinasikan dengan minyak nilam atau minyak mawar (Santoso, 1993). Menurut Indrawanto (2009), aroma akar wangi dihasilkan dari ester asam vetivenat, senyawa vetiveron, dan vetivenol.

Minyak atsiri dari tanaman genus *Vetiveria* sebagian besar mengandung terpen, siskuitergen alifatik, turunan hidrokarbon teroksigenasi dan hidrokarbon aromatik. Komponen utama minyak atsiri akar wangi terdiri dari senyawa golongan seskuitergen (30-40 %), seskuitergenol (18-25 %) dan seskuitergenon seperti asam benzoat, vetiverol, furfurol,  $\alpha$  dan  $\beta$  vetivone, vetivene dan vetivenil vetivenat. Selain itu, genus *Vetiveria* dari Perancis juga mengandung senyawa flavonoid, yaitu carlinoside, neocarlinoside, 6,8- di-C-arabinopyranosylluteolin, isoorientin dan tricic-5-O-glucoside (Champagnat dkk., 2008).

Minyak akar wangi mengandung berbagai senyawa, antara lain vetivenol, vetiveron ( $\alpha$  – vetivenol  $\beta$  – vetivon), vetiverol, vetivenil, vetivenat, vetiven, asam palmitat, asam benzoat (Gambar 2.1). Kandungan minyak akar wangi terbesar adalah vetivenol. Komposisi minyak akar wangi terdiri dari vetivenol sebanyak 60-75%, vetiveron sebanyak 7,8 – 35,1%, serta vetivene, asam palmitat, asam benzoat, dan asam vetivenat sebanyak 0,28%.

Minyak akar wangi yang berkualitas bagus memperlihatkan warna cairan tidak gelap, berwarna coklat kemerah-merahan, dan memiliki aroma agak berbau kayu (Sani, 2011).

Secara umum, *vetiver oil* mengandung senyawa volatile yang sebagian besar terdiri dari turunan seskuitergen, termasuk hidrokarbon, alkohol, aldehyd, dan keton. Selain itu, *vetiver oil* juga mengandung komponen minor seperti fenol dan nitrogen. Di sembilan negara termasuk Indonesia, terdapat 110 komponen kimia yang terkandung dalam *vetiver oil*. Komponen-komponen kimia tersebut antara lain khusimol (3.4-13.7%),  $\alpha$ -vetivone (2.5-6.3%),  $\beta$ -vetispirene (1.6-4.5%), dan vetiselinol (1.3-7.8%) (Chahal, dkk., 2015) (Gambar 2.1). Namun, minyak atsiri *V. zizanioides* dari berbagai daerah memiliki perbedaan komponen kimia.



Gambar 2.1. Struktur komponen kimia *vetiver oil* dari berbagai golongan a) hidrokarbon, b) alkohol, dan c) aldehyd/keton. Chahal dkk. (2015)

Senyawa mayor yang telah diisolasi dari *V. zizanioides* India adalah khusol, khusenol, khusitone,  $\gamma$ -cadinene dan laevojunenol. Senyawa mayor berstruktur siskuiterpene trisiklik yang berhasil diisolasi dari *V. zizanioides* yang tumbuh di Angola adalah asam khusenat, asam isokhusenat dan khusenol. Struktur siskuiterpene, khusimene dan asam zizanoat yang memiliki struktur yang sama dengan asam khusenat merupakan senyawa mayor yang telah berhasil diisolasi dari *V. zizanioides* Jepang. Senyawa mayor dari *V. zizanioides* Kongo adalah tricyclovetivenol, tricyclovetivene, dan khusimol. Ada 49 senyawa yang terkandung dalam minyak atsiri *V. zizanioides* dari Haiti yang komponen utamanya adalah senyawa trisiklik siskuiterpene seperti khusimol dan metil epizizanoat, senyawa bisiklik siskuiterpene seperti junenol atau juniper camphor, nootkatone,  $\alpha$ -vetivone dan khusimone. Senyawa minor lain yang terkandung dalam *V. zizanioides* dari Haiti antara lain elemol,  $\alpha$ -cadinol, hexadecane, senyawa (E)-Isoeugenol, p-Vinyl guaiacol, o-Guaiacol,  $\alpha$ -cubebene, dan  $\gamma$ -cadinene (Adams dkk., 2004).

Senyawa mayor yang terkandung dari *V. zizanioides* Italia yang diisolasi pada musim dingin saat umur tanaman 12 bulan adalah eremophilene, eudesmane, guaiane, nootkatone,

$\alpha$ -vetivone, (E)-isovalencenol, junenol dan juniper camphor. Selain itu juga ada komponen alcohol seperti (E)-isovalencenol dan khusimol (Massardo dkk., 2008). Minyak atsiri *Vetiveria* Perancis mengandung lebih dari 300 siskuitergen. Senyawa mayor yang terkandung di dalamnya adalah  $\alpha$ -vetivone,  $\beta$ -vetivone, dan khusimol. Senyawa  $\alpha$ -vetivone dan  $\beta$ -vetivone merupakan senyawa yang memiliki struktur bisiklik siskuitergen mengandung gugus ketone dengan rumus molekul  $C_{15}H_{22}O$  dan berat molekul 218,33. Sedangkan khusimol merupakan senyawa yang mempunyai struktur trisiklik siskuitergen beralkohol dengan rumus bangun  $C_{15}H_{24}O$ . Komponen penting lainnya adalah vetiverol, senyawa ini sangat mempengaruhi bilangan ester setelah asetilasi (Champagnant dkk., 2008). Menurut Mulyono (2012), peningkatan kadar vetiverol di dalam minyak akar wangi sekaligus dapat meningkatkan mutu minyaknya.

Kandungan minor dalam minyak atsiri ini antara lain zizanal, epizizanal, khusimone, metil zizanoat, metil epi zizanoate, junenol atau juniper camphor. Selain memiliki senyawa siskuitergen yang merupakan komponen mayor dalam minyak atsiri, tanaman ini juga mengandung fruktosa, sukrosa, glukosa dan tidak mengandung gliserol seperti tanaman yang lain (Champagnant dkk., 2008). Rahmawati (2010) melaporkan bahwa komponen utama minyak atsiri dari Garut terdiri dari cycloisolongifolene (20,59%), nootkatone (11,82%), spathulenol (8,50%), vellerdiol (8,04 %), juniper camphor (6,12 %), arromadendreneepoxide (6,90 %), sedangkan komponen utama minyak atsiri dari Gunung Kidul, Yogyakarta adalah vallencene (13,27%), nootkatone (9,27 %),  $\alpha$ -curcumene (12,21%), Vellerdiol (12,00 %), verridiflorol (7,05 %).

### 2.3 Biosintesis Minyak Atsiri

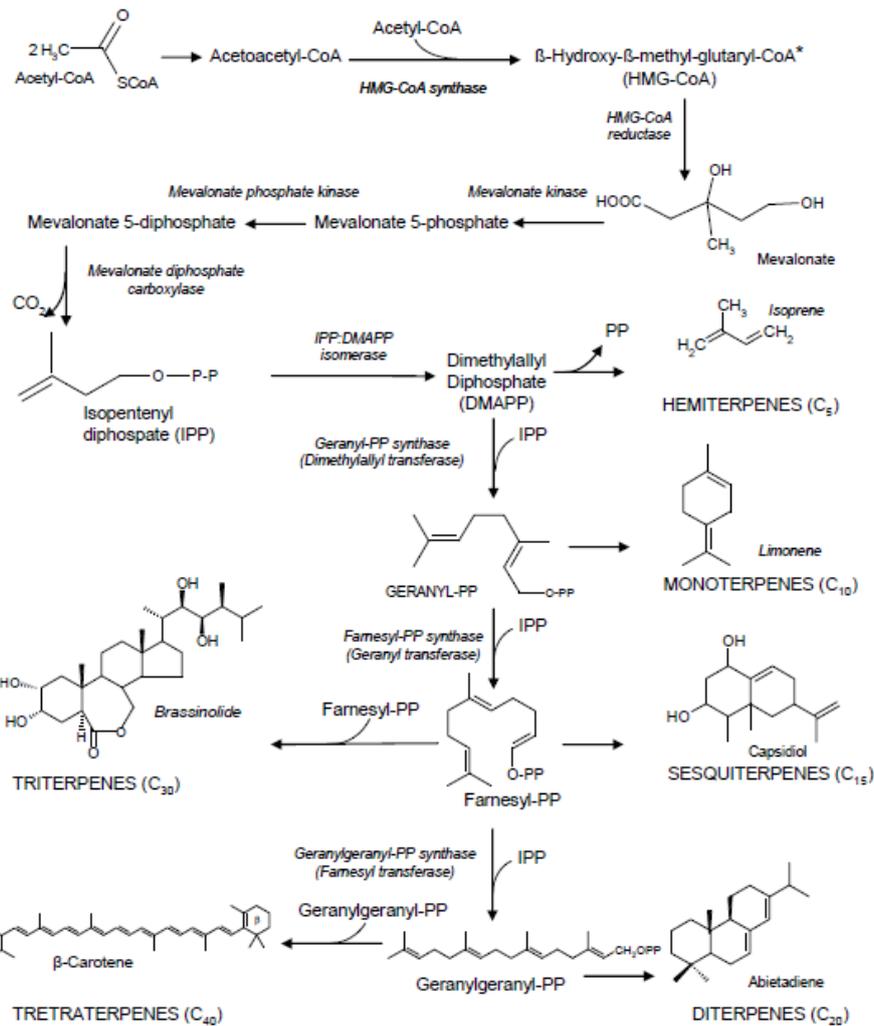
Minyak atsiri terbagi menjadi dua golongan, yaitu senyawa turunan terpena dan senyawa aromatik. Senyawa turunan terpena terbentuk melalui jalur biosintesis asam mevalonat, sedangkan senyawa aromatik terbentuk dari biosintesis asam sikimat melalui jalur fenil propanoid. Senyawa terpena sebagai penyusun minyak atsiri terbesar adalah golongan senyawa terpenoid yang terdiri dari monoterpen dan siskuitergen. Senyawa terpena dibangun dari unit isoprene aktif yaitu isopentenil pirofosfat. Isopentenil pirofosfat (IPP) terbentuk dari asam asetat melalui jalur asam mevalonat (Agusta, 2000).

Kondensasi satu unit isopentenil pirofosfat (IPP) dengan dimetilalil pirofosfat (DAMPP) membentuk geranil pirofosfat (C-10). Geranil pirofosfat diubah menjadi isomernya, yaitu neril pirofosfat. Hal ini disebabkan neril pirofosfat yang merupakan isomer trans dari geranil pirofosfat mempunyai stereokimia yang memungkinkan dalam pembantuan

cincin, sehingga terbentuk monoterpen siklik. Di sisi lain, cincin monoterpen pada neril pirofosfat dapat terbentuk dari IPP dan DAMPP melalui ikatan enzim pada zat antara atau pirofosfat ester (Agusta, 2000).

Pada awal proses biosintesis, dua molekul asetil-KoA menghasilkan asetoasetil-KoA melalui reaksi kondensasi Claisen. Kemudian asetoasetil-KoA bereaksi dengan asetil-KoA yang lain melalui adisi aldol stereospesifik dan diikuti dengan hidrolisis yang dikatalisis oleh enzim HMG-KoA sintase sehingga terbentuk ester  $\beta$ -hidroksi- $\beta$ -metilglutaril-KoA (HMG-KoA). Beberapa tahap reaksi dan pengaruh enzim HMG-KoA reduktase serta reduksi ester ke aldehyd melalui teokemiasetal akan membentuk asam mevaldat. Selanjutnya, asam mevaldat akan membentuk asam mevalonat (MVA) (Agusta, 2000). Enzim mevalonat kinase dan fosfomevalonat kinase mengkatalisis reaksi fosforilasi asam mevalonat menjadi isopentenil pirofosfat (IPP) melalui asam mevalonat 5-difosfat. Pada proses ini terjadi reaksi dehidroksilasi dan fosforilasi dengan adanya ATP, kemudian diikuti dengan reaksi dekarboksilasi dan fosforilasi yang dikatalisis oleh enzim mevalonat 5-difosfat dekarboksilase. Senyawa IPP memiliki bentuk isomer berupa dimetilalil pirofosfat (DMAPP). Kondensasi satu unit IPP dan DMAPP dengan pengaruh enzim fenil transferase dapat menghasilkan monoterpen difosfat berupa geranyl pirofosfat (GPP) (Agusta, 2000).

Senyawa GPP memiliki bentuk isomer berupa linalil pirofosfat (LPP) dan neril pirofosfat (NPP). GPP, LPP, dan NPP menghasilkan beberapa senyawa monoterpen. Senyawa monoterpen GPP dengan adanya proses siklikasi menghasilkan senyawa monosiklik mentil atau terpinil kation, selanjutnya membentuk senyawa terpen monosiklik dan bisiklik. GPP dan IPP saling berikatan membentuk farnesil pirofosfat (FPP). Kemudian, FPP membentuk senyawa siskuitерpen lain (Agusta, 2000) (Gambar 2.2).

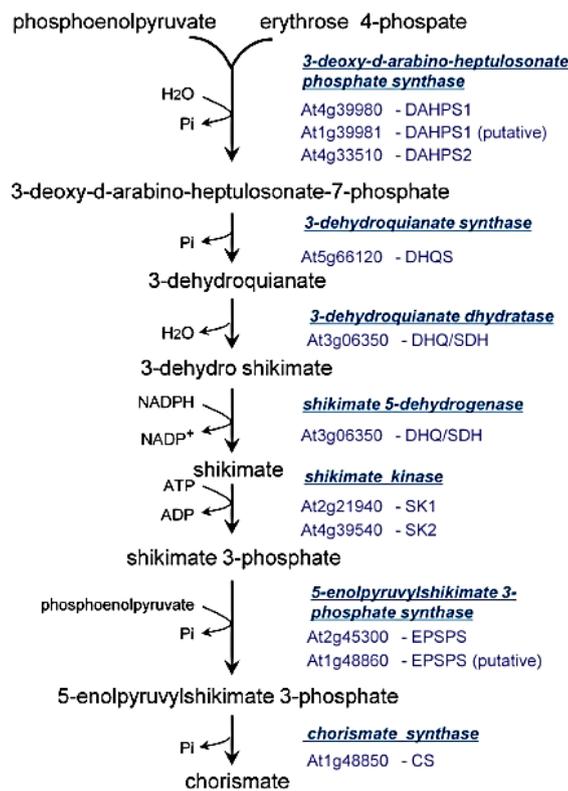


Gambar 2.2. Biosintesis terpenoid melalui jalur asam mevalonat. Iriti & Franco (2009).

Asam sikimat diisolasi pertama kali pada tahun 1885 dari tanaman *Illicium anisatum* L. Asam sikimat dibiosintesis dari metabolit primer karbohidrat dan berperan sebagai precursor berbagai senyawa metabolit sekunder. Asam sikimat merupakan precursor pembentukan asam amino dengan rantai samping berupa cincin aromatis, antara lain fenilalanin, tirosin, dan triptofan. Asam amino fenilalanin dapat berperan sebagai bahan untuk sintesis berbagai jenis metabolit sekunder, seperti fenil propanoid dan flavonoid (Raharjo, 2013).

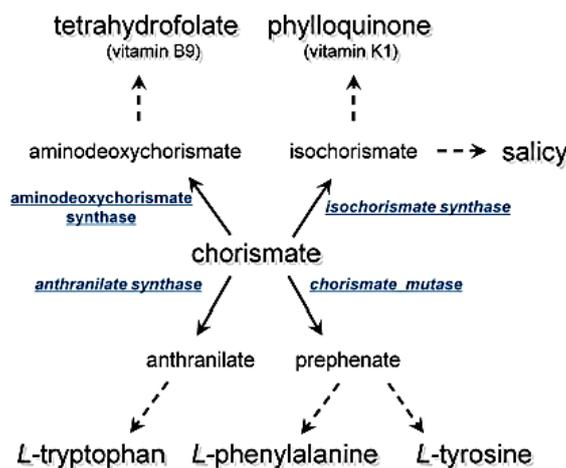
Beberapa senyawa golongan fenil propanoid yang terkandung dalam minyak atsiri antara lain asam sinamat, asam p-hidroksisinamat, dan asam kumarat. Senyawa golongan fenil propanoid ini berasal dari fenilalanin dan tirosin. Pada awal biosintesis fenil propanoid terjadi reaksi antara dua metabolit glukosa, eritrosa 4-fosfat, dan fosfoenol piruvat sehingga menghasilkan DAPH. Senyawa DAPH membentuk cincin asam 5-

dehidrokuinat kemudian menjadi asam 5-dehidrosikimat hingga berubah menjadi asam sikimat. Asam sikimat mengalami fosforilasi dan mengeluarkan zat antara berupa asam 5-fosfosikimat dan asam 5-fosfat-3-enolpirufilsikimat sehingga menghasilkan asam korisimat (Raharjo, 2013) (Gambar 2.3).



Gambar 2.3. Biosintesis korisimat melalui jalur fenil propanoid

Asam korisimat merupakan titik pusat zat antara yang selanjutnya diubah menjadi senyawa aromatik berupa asam antranilat dan triptifan serta senyawa nonaromatik berupa prefenat. Prefenat dapat diubah menjadi senyawa aromatik melalui dua jalur, yaitu proses dehidrasi dan dekarboksilasi serta proses dehidrogenasi dan dekarboksilasi. Proses dehidrasi dan dekarboksilasi berfungsi untuk membentuk asam fenil piruvat yang berperan dalam pembentukan fenilalanin, sedangkan proses dehidrogenasi dan dekarboksilasi berfungsi untuk menghasilkan asam p-hidroksifenilpiruvat yang berperan dalam pembentukan tirosina. Fenilalanin mengalami proses deaminasi enzimatis membentuk asam sinamat, kemudian proses hidroksilasi asam sinamat pada posisi para dan deaminasi tirosin membentuk asam p-kumarat (Agusta, 2000) (Gambar 2.4).



Gambar 2.4. Pembentukan senyawa aromatik dari korismat

Jalur biosintesis metabolit sekunder dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain stress, cahaya, nutrisi, dan zat pengatur tumbuh (ZPT). Stres lingkungan memacu tanaman untuk memproduksi metabolit sekunder sebagai upaya untuk bertahan hidup. Selain itu, adanya berbagai nutrisi dan ZPT dapat mengubah ekspresi jalur metabolisme yang memacu tanaman untuk memproduksi metabolit sekunder (Grech-Baran & Agniezka, 2012).

## 2.4 Potensi Teknik Kultur Sel untuk Produksi Metabolit Sekunder

Metabolit sekunder merupakan senyawa yang dihasilkan tumbuhan sebagai mekanisme pertahanan atau keberlangsungan hidup organisme terhadap stress (Ningsih, 2014). Metabolit sekunder digunakan oleh tanaman untuk melawan serangan herbivora dan patogen (Akula & Gokare, 2011). Selain itu, metabolit sekunder juga berperan dalam perlindungan terhadap kondisi lingkungan seperti radiasi, temperatur, dan sebagainya (Raharjo, 2013).

Metabolit sekunder disintesis oleh tumbuhan sebagai suatu proses biokimia ekstra yang dilakukan untuk mekanisme pertahanan terhadap stress lingkungan. Oleh sebab itu, metabolit sekunder pada tanaman tidak selalu disintesis sepanjang waktu. Berdasarkan hal tersebut, maka kandungan metabolit tanaman bersifat dinamis sesuai dengan waktu, musim, maupun usia tanaman (Raharjo, 2013). Kultur sel merupakan salah satu tipe kultur yang dapat digunakan untuk menghasilkan metabolit sekunder pada tanaman. Peningkatan produksi metabolit sekunder melalui teknik kultur dapat terjadi melalui perubahan ekspresi jalur metabolisme (Ningsih, 2014).

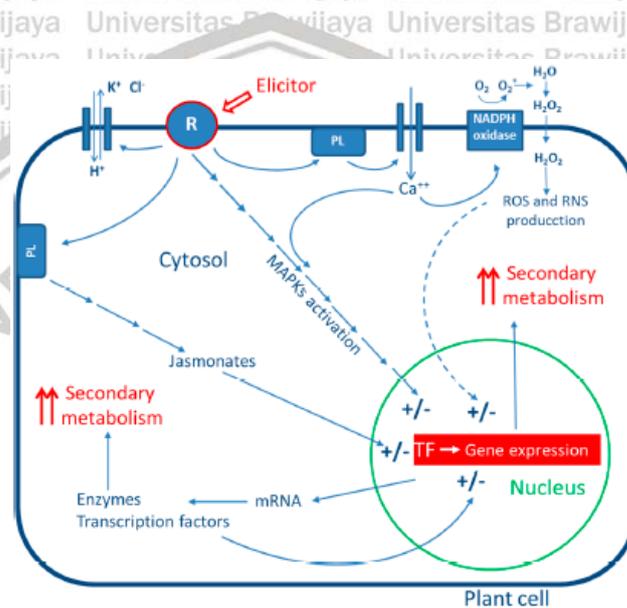
Peningkatan produksi metabolit sekunder dengan teknik kultur dapat dilakukan melalui beberapa tipe kultur, antara lain kultur kalus, kultur akar adventif, suspensi sel, dan *hairy root culture*. Penggunaan kultur kalus dalam peningkatan metabolit sekunder telah dilakukan pada tanaman *Bacopa monnieri* (Monica, 2013), *Plectranthus ornatus* Codd (Soares, 2013), dan *Artemisia annua* L. (Rizzello, 2014). Peningkatan metabolit sekunder melalui kultur akar adventif telah dilakukan pada tanaman *Psammosilene tunicoides* (Zhang, 2013), *Prunella vulgaris* L. (Fazal, 2014), dan *Peritassa campestris* (Paz, 2013). Beberapa penelitian juga melaporkan keberhasilan *hairy root culture* dalam meningkatkan metabolit sekunder, yaitu tanaman *Cannabis sativa* L. (Farag, 2015), *Valeriana sisymbriifolium* (Filizadeh, 2010), dan Edelweiss (Wawrosch, 2014). Menurut Adam (2004), minyak akar wangi yang dihasilkan dari teknik kultur mengandung alkanes dan alkanols yang lebih tinggi dibandingkan dengan minyak akar wangi yang dihasilkan dari tanaman akar wangi in vivo. Selain itu, Esyanti (2013) melaporkan bahwa terpenoid yang terkandung dalam minyak akar wangi yang dihasilkan dari kultur lebih tinggi daripada akar yang diambil dari lapang. Terpenoid yang terkandung dalam minyak atsiri dari akar hasil kultur dan akar dari tanaman lapang masing-masing adalah 4,9% dan 0,7%.

Keuntungan penerapan teknik kultur jaringan tanaman dalam peningkatan produksi metabolit sekunder yaitu produksi metabolit sekunder dapat dilakukan secara kontinu dan reliable, tanpa tergantung waktu dan musim. Keuntungan lainnya adalah diperoleh sel yang terbebas dari mikroba serta produksinya tidak tergantung pada iklim, tanah, dan lokasi geografis. Penerapan teknik kultur jaringan tanaman juga diharapkan mampu menghasilkan kandungan dan kualitas metabolit sekunder yang tinggi dalam waktu singkat (Ningsih, 2014).

## 2.5 Elisitasi dalam Peningkatan Metabolit Sekunder

Elisitasi merupakan salah satu upaya untuk meningkatkan produktivitas metabolit sekunder melalui pemberian elisitor. Elisitor ialah suatu molekul yang dapat merespon stres pada tanaman. Salah satu pengaruh yang ditimbulkan oleh elisitor adalah adanya depolarisasi sel tumbuhan, yaitu terjadinya aktivasi saluran ion endogen oleh elisitor. Elisitor juga dapat membentuk pori sehingga memungkinkan ion menembus membran tanpa perlu terikat pada reseptor dan aktivasi saluran ion (Estrada dkk., 2016). Pemberian elisitor pada medium kultur mampu menginisiasi dan meningkatkan biosintesis metabolit sekunder. Pembentukan metabolit sekunder dengan elisitor dapat terjadi melalui pengaktifan jalur sekunder dalam merespon stres (Ningsih, 2014). Pengaktifan jalur

sekunder dalam merespon stress diawali dari ikatan antara elisitor dan reseptor di membrane plasma. Elisitor dikenali oleh reseptor pada membrane plasma, kemudian  $K^+$  dan  $Cl^-$  keluar, sedangkan  $Ca^{2+}$  masuk menembus membrane plasma. Setelah itu terjadi fosforilasi protein membrane dan aktivasi protein kinase. Hal tersebut menstimulasi MAPK dan protein G sehingga terjadi tranportasi MAPKs dan produksi *secondary messenger* melalui protein G di nukleus. Selanjutnya terjadi aktivasi faktor transkripsi gen dan mengakibatkan terjadinya regulasi ekspresi gen yang terlibat dalam pembentukan metabolit sekunder, sehingga terjadi akumulasi metabolit sekunder (Gambar 2.5).



Gambar 2.5. Mekanisme umum kerja elisitor pada sel melalui aktivasi faktor transkripsi dari gen yang terlibat dalam pembentukan metabolit sekunder. Estrada dkk. (2016)

Elisitor yang ditambahkan pada medium kultur dapat berupa elisitor biotik maupun abiotik. Elisitor biotik berasal dari makhluk hidup, patogen atau dari tumbuhan itu sendiri, sedangkan elisitor abiotik dapat berupa faktor fisik atau senyawa kimia. Elisitor biotik yang dapat digunakan untuk peningkatan produksi metabolit sekunder meliputi polisakarida, protein, glikoprotein atau fragmen-fragmen dinding sel yang berasal dari fungi, bakteri, dan tanaman (Namdeo, 2007). Macam-macam polisakarida yang digunakan sebagai elisitor yaitu alginat, pektin, kitosan, glukon, guar gum, sukrosa, dan Arabic gum (Angelova dkk., 2006). Pemberian pektin pada konsentrasi 200 mg/L menghasilkan L-Dopa pada kultur suspensi *Mucuna pruriens* L. sebanyak 42,82 mg/g dengan 18/14 kali

peningkatan pada hari ke-9 setelah elisitasi (Raghavendra dkk., 2012). Pada hasil penelitian lain dilaporkan bahwa pemberian kitosan pada konsentrasi 0,2 mg/ml mampu menghasilkan anthraquinone, phenolic and flavonoid, masing-masing sebanyak 103,16; 48,57; and 75,32 mg/g DW (Baque dkk., 2012).

Elisitor abiotik adalah substansi yang dihasilkan dari zat non biologis, misalnya garam anorganik, ion logam, pH, dan sebagainya (Namdeo, 2007). Beberapa ion logam yang digunakan untuk elisitasi antara lain calcium, tembaga, mangan, cobalt, aluminium, timbal, chromium, dan sebagainya. Pemberian  $\text{CdCl}_2$  dengan konsentrasi 5 mM pada medium kultur dapat meningkatkan kandungan andrographolide pada kultur suspensi sel *Andrographis paniculata* 4,14 kali lebih tinggi dibandingkan kontrol (Gandi dkk., 2012). Cadmium (Cd) dapat mempengaruhi kandungan fenolik pada kultur suspensi sel *Vitis vinifera* cv. Pemberian  $\text{CdCl}_2$  pada konsentrasi 1mM selama 2 hari mampu memproduksi total phenolic (168,82 mg/100 g), total flavanol (15,94 mg/100 g), total flavonol (14,73 mg/100 g) dan trans-resveratrol (490,76  $\mu\text{g}/100$  g), sedangkan Pemberian  $\text{CdCl}_2$  pada konsentrasi 1 mM selama 6 hari mampu mneghasilkan  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  tocopherols (145,61; 25,52; dan 18,56  $\mu\text{g}/100$  g) (Cetin dkk., 2014). Pada penelitian lain dilaporkan bahwa pemberian  $\text{CdCl}_2$  dengan konsentrasi 8  $\mu\text{m}$  selama 2 hari sangat efektif dalam menginduksi biosintesis isoflavon phytoestrogen berupa daidzein dan genistein, masing-masing 21 kali dan 18 kali daripada kontrol. Namun, peningkatan konsentrasi dan lama inkubasi justru menurunkan produksi sintesis phytoestrogen pada kultur akar rambut *Psoralea corylifolia* (Satdive dkk., 2014). Pada penelitian lainnya dilaporkan bahwa pemberian  $\text{AlCl}_3$  250  $\mu\text{m}$  pada medium kultur selama 48 jam dapat menghasilkan tropane alkaloid (scopolamine) sebanyak 150% (Spollansky dkk., 2000).

## 2.6 Isolasi dan Identifikasi Komponen Kimia Minyak Atsiri

Metabolit sekunder dari berbagai bahan tanaman dapat diperoleh melalui beberapa teknik, antara lain penyulingan, ekstraksi dengan pelarut mudah menguap, dan ekstraksi dengan lemak padat (Moelyono & Muchtaridi, 2015). Ekstraksi merupakan suatu proses pemisahan dari bahan padat maupun cair dengan bantuan pelarut. Beberapa macam pelarut yang banyak dipakai untuk ekstraksi antara lain petroleum eter, alkohol, benzena, dan heksana. Heksana adalah senyawa hidrokarbon golongan *alkane* dengan rumus  $\text{C}_6\text{H}_{14}$  yang merupakan fraksi petroleum eter dengan kisaran titik didih 65-70  $^\circ\text{C}$ . Heksana bersifat selektif dalam melarutkan zat, menghasilkan jumlah kecil lilin, albumin, dan zat warna, namun dapat mengekstrak zat pewangi dalam jumlah besar (Irawan, 2010). Menurut

Munawaroh & Prima (2010), heksana dalam keadaan standar berupa cairan yang tidak berwarna dan tidak larut dalam air. Metode ekstraksi pelarut menguap dengan pelarut n-heksan memberikan *concrete* dengan rendemen 320% pada minyak bunga melati (Sani dkk., 2012).

Hasil isolasi metabolit sekunder umumnya masih berupa campuran, oleh sebab itu diperlukan metode pemisahan metabolit sekunder tersebut. Metode pemisahan dapat dilakukan dengan kromatografi dan elektroforesis konvensional. Pemisahan kromatografi dilakukan berdasarkan perbedaan distribusi molekul-molekul dari komponen di antara dua fasa yaitu fasa gerak dan fasa diam. Metode pemisahan dengan kromatografi antara lain berupa Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan Kromatografi Gas-Spektrofotometer Massa (GC-MS) (Hendayana, 2010).

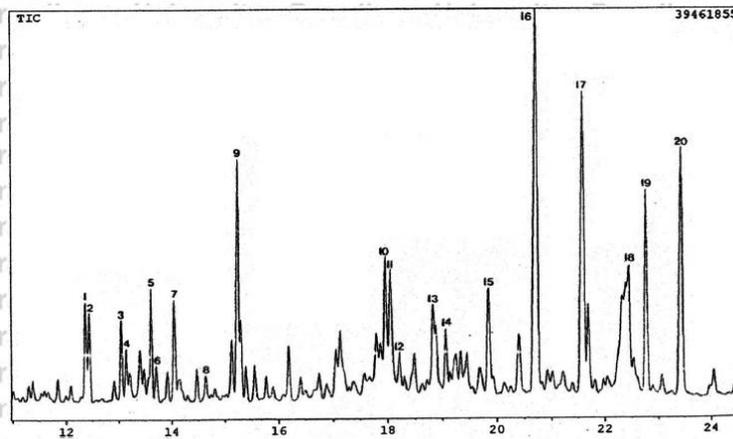
Kromatografi Lapis Tipis (KLT) merupakan suatu metode pemisahan suatu senyawa berdasarkan perbedaan distribusi dua fase yaitu fase diam berupa plat silika gel dan fase gerak berupa pelarut. Pelarut yang digunakan disesuaikan dengan sifat senyawa dalam campuran dan sering disebut dengan eluen (Sastrohamidjojo, 2007). Eluen yang baik ialah eluen yang bisa memisahkan senyawa dalam jumlah yang banyak yang ditandai dengan munculnya noda. Noda yang terbentuk tidak berekor dan jarak antara noda satu dengan yang lainnya jelas (Harborne, 1987). Pemilihan eluen terbaik didasarkan pada campuran eluen yang dapat membawa komponen naik menuju garis akhir pelat silika, sehingga diperoleh perbedaan kepolaran diantara pelarut tersebut dan menghasilkan spot yang nyata. Dengan demikian, polaritas eluen yang digunakan berpengaruh terhadap pergerakan spot. Perbedaan pergerakan spot menunjukkan bahwa senyawa-senyawa tersebut mempunyai tingkat kepolaran yang berbeda. Berdasarkan teori "*like dissolve like*", dengan fasa diam yang bersifat polar dan fasa gerak yang cenderung non polar, maka noda paling atas adalah kelompok senyawa-senyawa non polar sedangkan noda paling bawah adalah kelompok senyawa-senyawa polar yang ada dalam minyak atsiri suatu tanaman. Beberapa keuntungan dari metode KLT yaitu prosedurnya lebih sederhana, membutuhkan waktu yang relatif singkat, dapat digunakan untuk memisahkan sampel yang sangat kecil sampai 20 nanogram, pemisahan lebih sempurna untuk senyawa kompleks dalam larutan, mudah dideteksi, dan lebih sensitive (Kumar dkk., 2013).

Kromatografi gas merupakan kromatografi modern yang menggunakan gas sebagai fasa geraknya. Dalam kromatografi gas, gas digunakan sebagai fasa gerak, sedangkan untuk fasa diam digunakan zat padat atau zat cair. Kromatografi gas dapat memberikan informasi kualitatif maupun kuantitatif. Informasi kualitatif berupa identifikasi jenis

komponen dalam suatu campuran, sedangkan informasi kuantitatif berupa banyaknya kandungan masing-masing komponen yang terdapat pada suatu campuran (Hendayana, 2010).

Mekanisme kerja kromatografi gas yaitu gas dalam silinder baja bertekanan tinggi dialirkan melalui kolom yang berisi fasa diam. Cuplikan senyawa yang akan dipisahkan dimasukkan ke dalam aliran gas. Cuplikan senyawa tersebut selanjutnya dibawa oleh gas pembawa ke dalam kolom sehingga terjadi proses pemisahan di dalam kolom. Komponen-komponen senyawa yang telah terpisahkan meninggalkan kolom satu per satu. Jenis masing-masing komponen dan jumlahnya dideteksi oleh detektor yang terletak di ujung kolom. Salah satu jenis detektor yang dapat digunakan untuk mendeteksi komponen-komponen dalam campuran minyak atsiri adalah spektrofotometer massa. Saat gas masuk ke spektrofotometer massa, molekul-molekul dari senyawa ditembak dengan elektron berenergi tinggi. Akibatnya, molekul tersebut pecah menjadi molekul-molekul yang lebih kecil. Pecahan-pecahan molekul dapat terdeteksi berdasarkan massanya yang digambarkan sebagai spektra massa. Jadi, setiap komponen campuran yang sudah terpisahkan dengan kromatografi gas akan digambarkan dalam satu spektra massa. Hasil deteksi komponen-komponen dalam campuran direkam dengan rekorder sehingga muncul peak-peak yang disebut dengan kromatogram. Dengan demikian, data tentang struktur dan identitas komponen-komponen dalam senyawa ditampilkan dalam bentuk kromatogram (Hendayana, 2010).

Kromatogram digambarkan dengan grafik berupa kerucut-kerucut yang sering disebut dengan *peak*. *Peak* ini merupakan hasil rekaman yang menggambarkan urutan keluarnya komponen dalam senyawa dari kolom. Sumbu horizontal dalam kromatogram menunjukkan waktu yang umumnya dinyatakan dalam menit, sedangkan sumbu vertikal menunjukkan identitas komponen senyawa. Jumlah komponen yang terkandung dalam senyawa ditunjukkan dengan jumlah *peak* yang muncul pada kromatogram, sedangkan kuantitas masing-masing komponen dihitung berdasarkan luas *peak*. Semakin besar luas *peak* maka kuantitas komponen tersebut semakin besar (Hendayana, 2010) (Gambar 2.6.).



Gambar 2.6. Kromatogram minyak akar wangi dari Garut (Abraham, 2011)

Kromatografi Gas-Spektrofotometer Massa (GC-MS) merupakan gabungan antara kromatografi gas dan spektrofotometri massa. Kromatografi gas berfungsi sebagai pemisah berbagai komponen campuran dalam sampel, sedangkan spektrofotometri massa berfungsi untuk mendeteksi masing-masing molekul dari komponen yang telah terpisah pada sistem kromatografi gas (Agusta, 2000). GC-MS sering digunakan untuk analisis komponen minyak atsiri karena minyak atsiri bersifat mudah menguap (Moelyono & Muchtaridi, 2015).

Metode GC-MS dapat memisahkan campuran yang cukup rumit dengan cepat dan akurat, menganalisis cuplikan dalam jumlah yang sangat kecil, dan menghasilkan data berupa struktur dan identitas senyawa organik. Selain itu, dengan metode GC-MS efek penguapan dapat dihindari bahkan dihilangkan sama sekali (Agusta, 2000).

Metode pemisahan metabolit sekunder dengan metode GC-MS membutuhkan waktu relatif lama. Hal ini disebabkan oleh laju aliran fasa gerak yang hanya dipengaruhi oleh gaya gravitasi bumi. Ukuran diameter partikel yang cukup besar menjadikan luas permukaan fasa diam relatif kecil sehingga tempat untuk berinteraksi antara komponen-komponen dengan fasa diam menjadi terbatas. Apabila ukuran diameter partikel diperkecil dengan tujuan menambah luas permukaan fasa diam, maka aliran fasa gerak akan semakin lambat bahkan fasa gerak tidak mengalir sama sekali. Selain itu, fasa diam yang sudah dipakai tidak dapat digunakan lagi untuk pemisahan campuran yang lain karena fasa diam sulit diregenerasi (Hendayana, 2010).

Keberhasilan metode GC-MS dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain daya interaksi antara komponen-komponen dalam campuran dengan fasa diam dan fasa gerak. Apabila beberapa komponen di dalam campuran memiliki daya interaksi dengan fasa diam

atau fasa gerak yang hampir sama, maka komponen-komponen dalam campran tersebut sulit dipisahkan (Hendayana, 2010).

## 2.7 Kerangka Konsep Penelitian

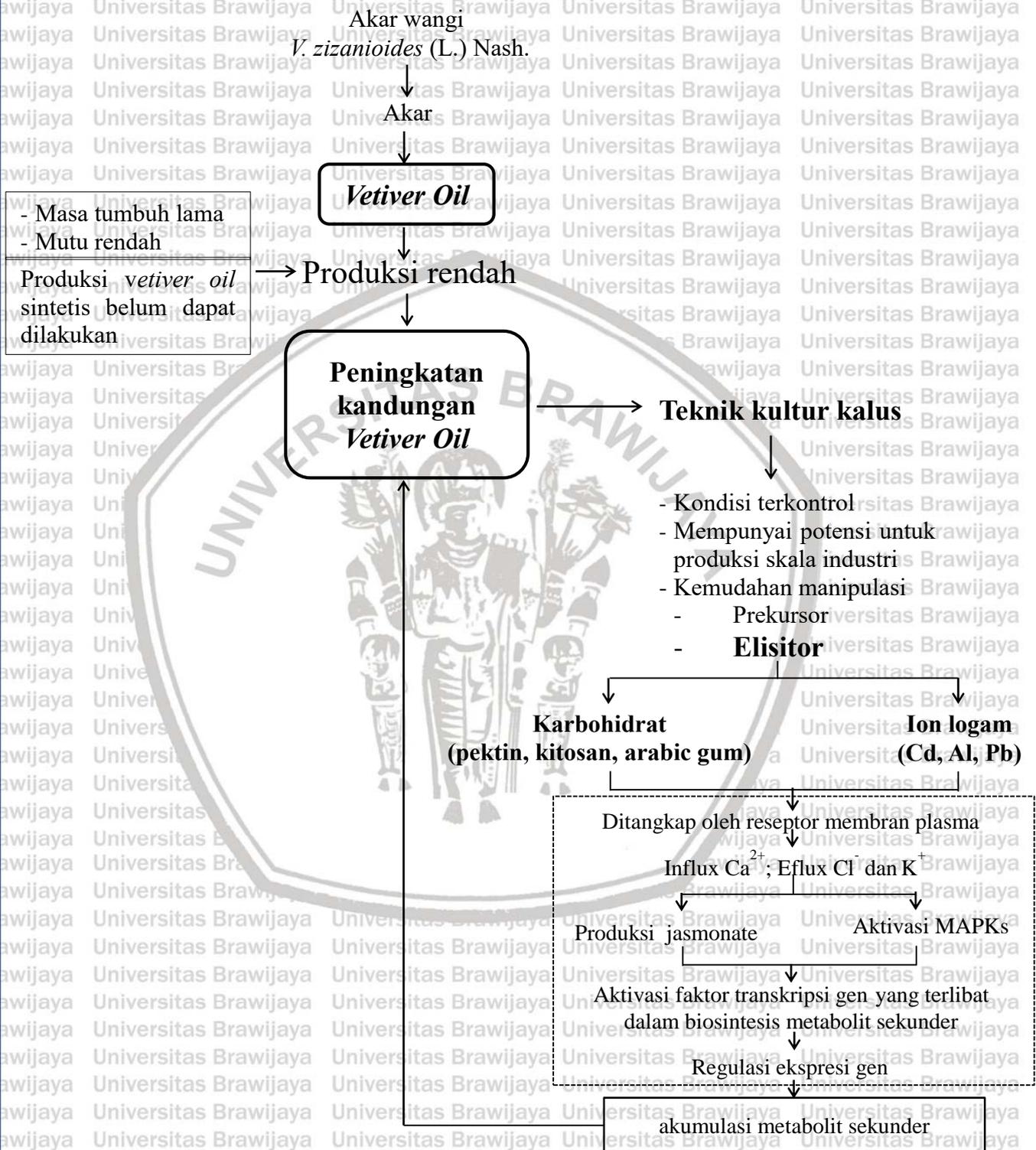
*Vetiver oil* merupakan minyak atsiri yang dihasilkan dari akar wangi (*Vetiveria zizanioides* (L.) Nash.). Kebutuhan *vetiver oil* semakin meningkat seiring dengan perkembangan industri yang menggunakan *vetiver oil* sebagai bahan baku industri tersebut, seperti industri parfum, kosmetik, dan aromaterapi. Namun, Indonesia hanya mampu memenuhi sekitar 20% dari kebutuhan *vetiver oil* tersebut dengan rata-rata produksi *vetiver oil* sebesar 25-30 ton per tahun. Rendahnya produksi *vetiver oil* disebabkan oleh berbagai faktor, antara lain lamanya masa tumbuh akar wangi yang mencapai umur 14-16 bulan, mutu *vetiver oil* yang rendah, dan senyawa kimia *vetiver oil* yang tidak dapat diproduksi secara sintetis. Berdasarkan hal tersebut, maka diperlukan upaya untuk meningkatkan produksi *vetiver oil*.

Teknik kultur merupakan salah satu teknik yang dapat digunakan untuk meningkatkan produksi *vetiver oil*. Teknik kultur dapat diterapkan untuk produksi metabolit sekunder dalam skala besar dengan waktu singkat serta peningkatan kadar dan mutu senyawa bioaktif. Peningkatan produksi *vetiver oil* melalui teknik kultur dapat dilakukan melalui kultur kalus, suspensi sel, dan *hairy root culture*. Salah satu upaya yang dapat digunakan untuk peningkatan produksi *vetiver oil* melalui kultur kalus yaitu elisitasi.

Elisitasi merupakan upaya peningkatan kandungan metabolit sekunder dengan penambahan elisitor pada medium kultur. Elisitor yang ditambahkan pada medium kultur dapat berupa elisitor biotik maupun abiotik. Salah satu contoh elisitor biotik adalah karbohidrat, sedangkan elisitor abiotik dapat berupa ion logam. Elisitor biotik berupa karbohidrat antara lain pektin, kitosan, arabic gum, sedangkan beberapa elisitor ion logam yaitu Cd, Al, Pb. Elisitor berperan untuk mengaktifkan gen dalam tumbuhan dengan mengkode enzim yang diperlukan untuk sintesis metabolit sekunder.

Kerja elisitor dalam pengaktifan gen dapat diawali melalui terjadinya ikatan antara elisitor dengan reseptor di membran plasma. Mula-mula elisitor dikenali oleh reseptor di membran plasma. Kemudian terjadi perubahan potensial membran plasma sehingga  $K^+$  dan  $Cl^-$  keluar, sedangkan  $Ca^{2+}$  masuk menembus membran plasma. Setelah itu terjadi fosforilasi protein membran dan aktivasi protein kinase yang menginduksi aktivasi MAPKs dan produksi jasmonat. Kemudian terjadi aktivasi faktor transkripsi gen dan mengakibatkan terjadinya regulasi ekspresi gen melalui pengkodean enzim yang terlibat

dalam pembentukan metabolit sekunder, sehingga terjadi akumulasi metabolit sekunder. Dengan demikian, elisitasi pada kultur kalus dapat digunakan sebagai salah satu metode untuk peningkatan produksi *vetiver oil* (Gambar 2.7).



Keretangan: Langkah-langkah di dalam tanda ----- tidak dilakukan

Gambar 2.7. Kerangka konsep penelitian

### BAB III METODE PENELITIAN

#### 3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

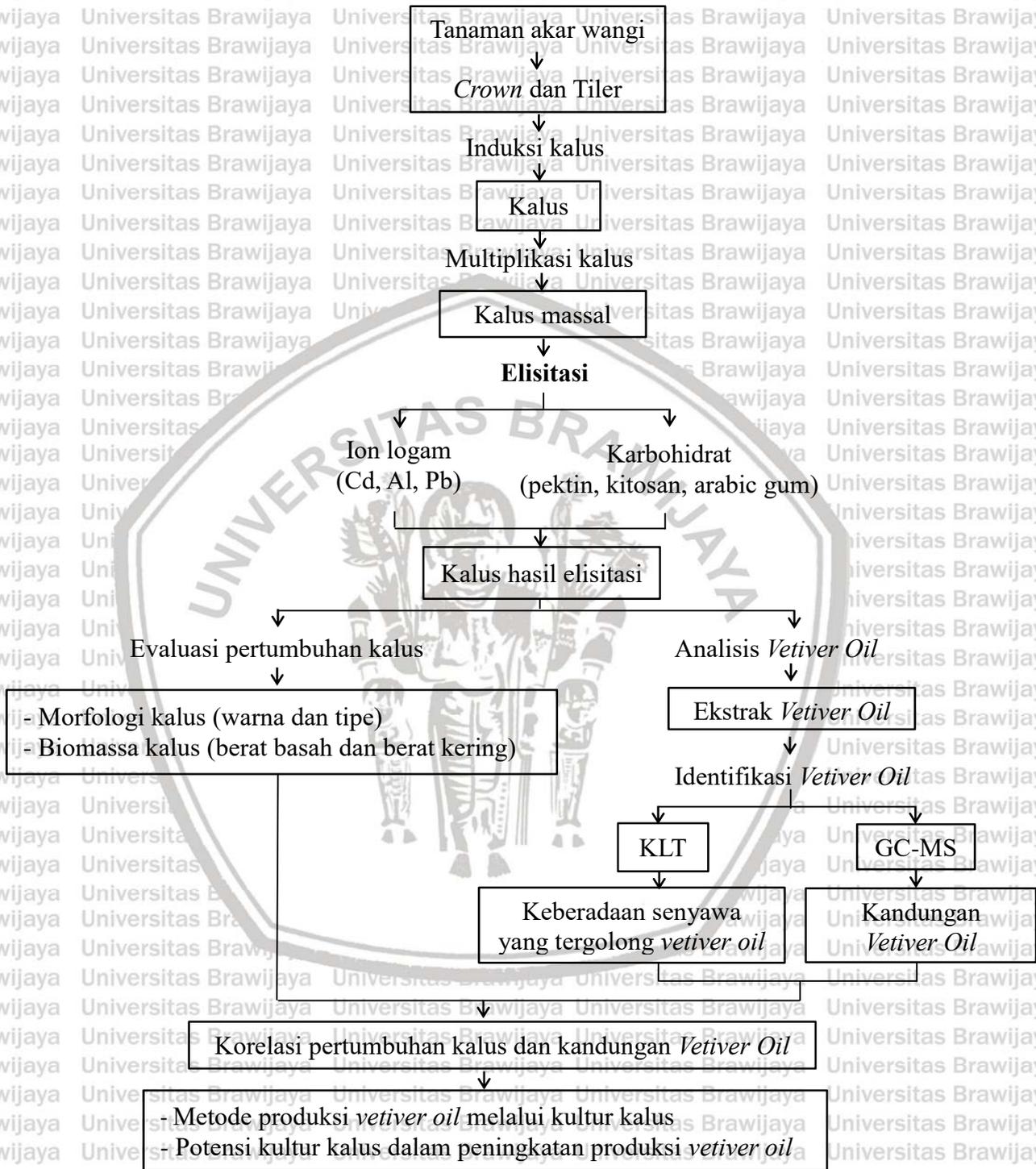
Penelitian Peningkatan Kandungan *Vetiver Oil* Akar Wangi (*Vetiveria zizanioides* (L.) Nash.) Secara *In Vitro* melalui Elisitasi dengan Ion Logam (Cd, Al, Pb) dan Karbohidrat (Pektin, Kitosan, Arabic Gum) pada bulan Januari hingga Desember 2017. Penelitian ini bertempat di Laboratorium Fisiologi, Kultur Jaringan, dan Mikroteknik, Jurusan Biologi dan rumah kaca Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, serta Laboratorium Sentral Ilmu Hayati, Universitas Brawijaya, Malang.

#### 3.2 Kerangka Operasional Penelitian

Penelitian dilakukan melalui beberapa tahapan, yaitu induksi dan multiplikasi kalus akar wangi, elisitasi kalus akar wangi dengan ion logam dan polisakarida, isolasi *vetiver oil* akar wangi, analisis kandungan *vetiver oil*, serta analisis data (Gambar 3.1). *Crown* dan tiler akar wangi digunakan sebagai eksplan induksi kalus. Kalus yang terbentuk selanjutnya dimultiplikasi agar diperoleh kalus dalam jumlah banyak dan digunakan sebagai bahan elisitasi. Elisitasi dilakukan dengan cara kalus dikulturkan pada medium MS+2,4-D 0,75 ppm+ kinetin 0,5 ppm dengan penambahan ion logam (Cd, Al, Pb) pada konsentrasi 0.1 mM atau karbohidrat (pektin, kitosan, arabic gum) pada konsentrasi 100 ppm. Sebagai kontrol, kalus dikulturkan pada medium MS+2,4-D 0,75 ppm+ kinetin 0,5 ppm tanpa penambahan elisitor. Kultur diinkubasi pada suhu ruang selama delapan minggu. Kalus hasil perlakuan elisitasi selama delapan minggu diamati pertumbuhannya serta diidentifikasi komponen kimia *vetiver oil*nya. Evaluasi pertumbuhan yang dilakukan meliputi morfologi dan biomassa kalus.

Analisis komponen kimia diawali dengan isolasi *vetiver oil* dari kalus tanaman akar wangi. Isolasi *vetiver oil* dilakukan dengan metode ekstraksi. Ekstrak *vetiver oil* yang diperoleh kemudian dianalisis menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan Kromatografi Gas-Spektrofotometer Massa (GC-MS). Dengan metode KLT maka akan diketahui keberadaan senyawa *vetiver oil* yang terkandung dalam kalus, sedangkan melalui GC-MS maka akan diperoleh informasi tentang jenis, jumlah, dan konsentrasi masing-masing komponen kimia yang terkandung dalam *vetiver oil*. Dari hasil penelitian ini diharapkan akan diperoleh metode produksi *vetiver oil* melalui kultur kalus dan diketahui

potensinya dalam peningkatan produksi *vetiver oil*, serta diketahui hubungan antara pertumbuhan sel kalus dengan biosintesis senyawa *vetiver oil* akar wangi (Gambar 3.1).



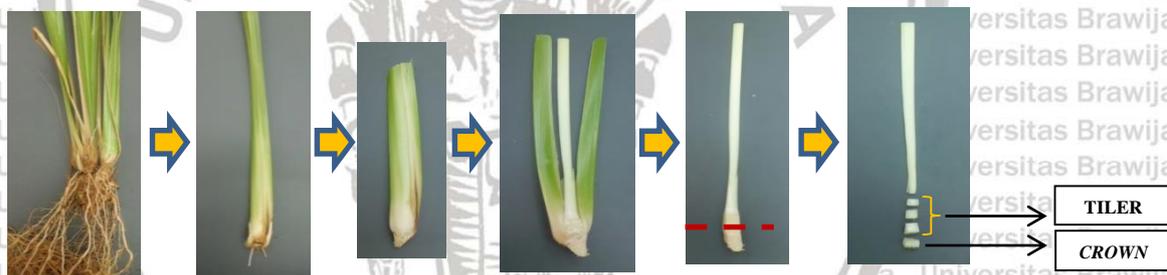
Gambar 3.1. Kerangka operasional penelitian

### 3.3 Tahapan Penelitian

Penelitian dilakukan melalui beberapa tahapan, yaitu induksi dan multiplikasi kalus akar wangi, elisitasi kalus dengan ion logam dan karbohidrat, isolasi *vetiver oil*, serta analisis kandungan *vetiver oil* akar wangi dengan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan Kromatografi Gas-Spektrofotometer Massa (GC-MS).

#### 3.3.1 Induksi dan Multiplikasi Kalus Akar Wangi

Induksi dan multiplikasi kalus bertujuan agar diperoleh kalus dalam jumlah banyak dan digunakan sebagai bahan elisitasi. Tanaman akar wangi berasal dari Kampung Sengklek, Desa Pamalayan, Kecamatan Bayongbong, Kabupaten Garut, Jawa Barat. Tanaman akar wangi dicuci dengan air hingga bersih, dipotong sepanjang 4 cm, dan dihilangkan bagian akarnya. Potongan tanaman akar wangi bersih dicelupkan ke dalam alkohol 96% selama satu menit kemudian digojok dengan bayclin (bahan aktif 5,25% NaClO) 80% selama 25 menit dan dibilas dengan aquades steril sebanyak dua kali, masing-masing selama 5 menit. Potongan akar wangi steril dibelah dan diambil bagian *crown* dan tiler sebesar  $\pm 0,1$  cm (Gambar 3.2).



Gambar 3.2 Pengambilan eksplan dari tanaman akar wangi  
Keterangan: = dipotong

Eksplan *crown* dan tiler dikulturkan ke dalam medium MS dengan penambahan 2,4-D 0,75 ppm dan kinetin (0; 0,3; 0,5; 0,75; 1) ppm. Kultur diinkubasi dengan intensitas cahaya 600 lux pada suhu 25-26 °C selama delapan minggu. Setiap perlakuan diulang lima kali (5 botol) dan setiap botol terdiri dari satu eksplan untuk *crown* dan tiga eksplan untuk tiler.

Kalus yang terbentuk selanjutnya dimultiplikasi dengan cara disubkultur pada medium MS dengan penambahan 2,4-D 0.75 ppm dan kinetin 0.5 ppm setiap delapan minggu sebanyak tiga kali. Kalus hasil subkultur ketiga yang berumur 2 bulan setelah subkultur digunakan sebagai bahan elisitasi.

### 3.3.2 Elisitasi Kalus Akar Wangi dengan Ion Logam dan Karbohidrat

Kultur kalus bertujuan untuk menghasilkan sel-sel sebagai bahan untuk mendapatkan metabolit sekunder. Kalus dalam botol kultur diambil dengan pinset dan ditransfer ke dalam cawan petri yang telah diberi kertas saring steril. Kalus sebanyak 0,2 gram dimasukkan ke dalam medium MS+2,4-D 0,75 ppm+ kinetin 0,5 ppm dengan penambahan ion logam (Cd, Al, Pb) pada konsentrasi 0,1 mM dan karbohidrat (pektin, kitosan, arabic gum) pada konsentrasi 100 ppm. Sebagai kontrol, kalus dikulturkan pada medium MS+2,4-D 0,75 ppm+ kinetin 0,5 ppm tanpa penambahan elisitor. Kultur diinkubasi dalam ruang dengan intensitas cahaya 600 lux pada suhu 25-26 °C selama delapan minggu. Setiap perlakuan diulang sepuluh kali (10 botol) dan setiap botol terdiri dari 0,2 gram kalus.

Kalus perlakuan elisitasi selama delapan minggu setelah kultur diamati morfologi kalus (warna dan tipe kalus) serta biomassa kalus (berat basah dan berat kering). Setelah pertumbuhan kalus diamati, kalus hasil elisitasi dihitung kadar air total dan air sisa serta dianalisis kandungan metabolit sekundernya.

Penentuan kadar air total dan air sisa dilakukan dengan cara kalus hasil elisitasi ditimbang sebesar 0,5 gram, kemudian dimasukkan ke dalam oven pada suhu 60 °C selama 5 menit dan ditimbang. Kalus hasil elisitasi yang telah dikeringkan pada suhu 60 °C dimasukkan ke dalam oven kembali pada suhu 105 °C selama 5 menit dan ditimbang, sehingga diperoleh kalus hasil pengeringan bertahap. Data biomassa kalus pada masing-masing tahapan pengeringan digunakan sebagai data untuk penghitungan kadar air total dan kadar air sisa.

### 3.3.3 Isolasi *Vetiver Oil* Akar Wangi

Isolasi *vetiver oil* dari kalus akar wangi dilakukan dengan metode ekstraksi. Kalus hasil elisitasi dimasukkan ke dalam oven pada suhu 60 °C selama 5 menit. Kalus hasil pengeringan pada suhu 60 °C selama 5 menit ditimbang sebanyak 10 gram kemudian diekstraksi menggunakan 50 ml n-heksana. Kalus dalam pelarut n-heksana disonikasi selama 25 menit dan dishaker pada kecepatan 120 rpm selama 24 jam, serta diulang sebanyak tiga kali. Ekstrak n-heksana yang diperoleh disaring dan supernatan dievaporasi menggunakan gas nitrogen hingga diperoleh volume ekstrak sebanyak 2 ml (*concrete vetiver oil*). *Concrete vetiver oil* yang diperoleh digunakan sebagai bahan untuk analisis KLT dan GC-MS.

### 3.3.4 Analisis Kandungan *Vetiver Oil* dengan metode *Gas Chromatography - Mass Spectrometry* (GC-MS)

Analisis awal *vetiver oil* dilakukan dengan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Ekstrak *vetiver oil* ditotolkan pada plat silica gel 60 F<sub>254</sub>, kemudian dielusi dengan larutan benzene dan ethyl acetate (19:1). Pengamatan dilakukan di bawah sinar UV-Vis pada panjang gelombang 254 dan 366 nm, selanjutnya ditentukan nilai R<sub>f</sub> dengan cara menghitung jarak eluen dari batas bawah hingga sampel dibagi dengan jarak eluen dari batas bawah hingga batas atas. Pada analisis KLT maka diketahui keberadaan suatu senyawa yang terkandung dalam *vetiver oil* dari kultur kalus hasil elisitasi yang ditunjukkan dengan adanya spot pada plat KLT. Adanya kesamaan nilai R<sub>f</sub> antara sampel dan standart *vetiver oil* menunjukkan bahwa ekstrak minyak dari kalus hasil perlakuan elisitasi mengandung *vetiver oil*.

Analisis *vetiver oil* berikutnya dilakukan dengan *Gas Chromatography - Mass Spectrometry* (GC-MS) QP-2010 Ultra. Kondisi alat GC-MS saat analisis sampel yaitu jenis pengion EI (*Electron Impact*), gas pembawa Helium 68.3 KPa, jenis kolom HP-5MS, panjang kolom 30 meter, diameter kolom 0,25 mm, suhu kolom 50-300 °C, injektor suhu 250 °C, detector suhu 310 °C, dan kecepatan kenaikan suhu 10 °C/menit.

Pada analisis GC-MS diperoleh dua informasi, yaitu hasil analisis kromatografi gas yang ditampilkan dalam bentuk kromatogram dan hasil analisis spektrofometri massa yang ditampilkan dalam bentuk spektrum massa. Jumlah dan kadar masing-masing komponen kimia yang terkandung dalam *vetiver oil* ditentukan berdasarkan jumlah dan luas area *peak* (puncak) yang terbentuk pada kromatogram. Jenis dan jumlah fragmen molekul yang terbentuk dari suatu komponen kimia pada masing-masing *peak* kromatogram ditunjukkan dengan spektrum massa.

### 3.4 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) dengan ulangan sebagai kelompok. Pada tahap induksi kalus digunakan dua faktor, yaitu jenis eksplan dan konsentrasi kinetin (0; 0,3; 0,5; 0,75, dan 1) ppm, sedangkan pada tahap elisitasi digunakan satu faktor, yaitu jenis elisitor ion logam (Cd, Al, Pb) atau karbohidrat (pektin, kitosan, arabic gum). Setiap perlakuan terdiri dari 0,2 gram kalus dan diulang sebanyak sepuluh kali (sepuluh botol).

### 3.5 Analisis Data

Data penelitian yang diperoleh meliputi pertumbuhan kalus, rendemen minyak atsiri serta jumlah komponen dan kandungan kimia *vetiver oil*.

Kadar air total dan kadar air sisa yang diperoleh dari pengeringan kalus secara bertahap serta kadar *vetiver oil* yang diperoleh dari ekstraksi menggunakan pelarut menguap dihitung berdasarkan rumus 1, 2, dan 3 sebagai berikut:

$$\text{Kadar air total} = \frac{W_0 - W_{105}}{W_0} \times 100\%$$

Keterangan:  
 $W_0$  = berat basah kalus  
 $W_{60}$  = berat kering kalus pada suhu 60 °C  
 $W_{105}$  = berta kering kalus pad suhu 105 °C

.....(1)

$$\text{Kadar air sisa} = \frac{W_{60} - W_{105}}{W_{60}} \times 100\%$$

.....(2)

$$\text{Rendemen minyak atsiri (w/w)} = \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat kalus yang diekstrak}} \times 100\%$$

.....(3)

Data biomassa kalus (berat basah dan berat kering) dianalisis menggunakan ANOVA pada tingkat signifikasi 95%. Jika hasil analisis data ANOVA menunjukkan ada beda nyata, maka dilakukan uji lanjutan yaitu uji Duncan.

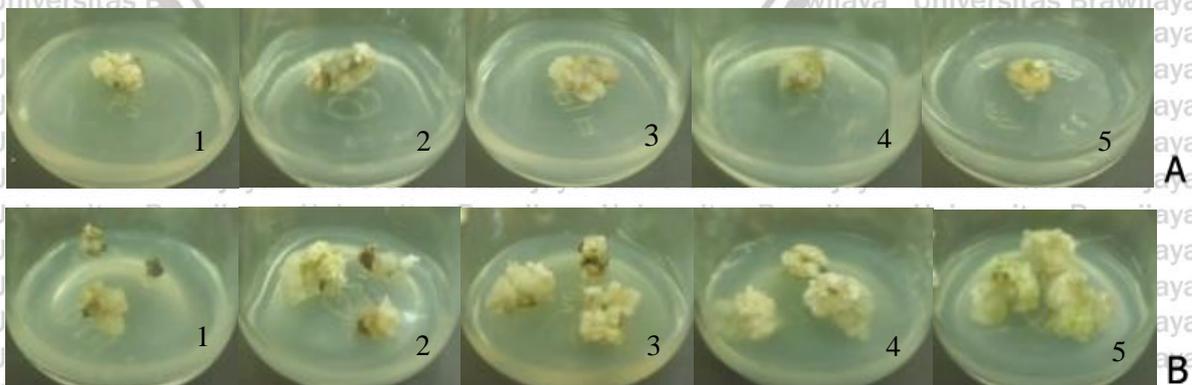


## BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

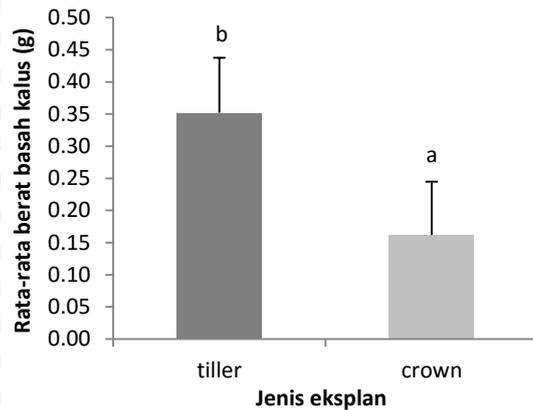
### 4.1 Pengaruh Jenis Eksplan dan Konsentrasi Kinetin terhadap Induksi dan Pertumbuhan Kalus dari Tanaman Akar Wangi

Kalus tanaman akar wangi dapat diinduksi dari eksplan *crown* dan tiler yang dikulturkan pada media MS dengan penambahan zat pengatur tumbuh 2,4-D atau 2,4-D dan kinetin. Kalus pertama kali terbentuk dari bagian tepi potongan eksplan diikuti dengan seluruh permukaan eksplan. Kalus yang terbentuk berwarna kuning atau putih kekuningan dan bening.

Pembentukan dan pertumbuhan kalus tanaman akar wangi dipengaruhi oleh jenis eksplan yang digunakan untuk inisiasi kalus. Jenis eksplan berpengaruh secara signifikan terhadap pembentukan dan pertumbuhan kalus dari tanaman akar wangi. Pembentukan kalus dari eksplan tiler lebih cepat dibandingkan dengan pembentukan kalus dari eksplan *crown*. Kalus terbentuk dari eksplan tiler mulai umur satu minggu setelah kultur, sedangkan kalus dari eksplan *crown* baru mulai terbentuk setelah umur empat minggu kultur. Selain pembentukan kalus lebih cepat, pertumbuhan kalus dari eksplan tiler juga lebih baik dibandingkan dengan eksplan *crown* (Gambar 4.1). Pada umur kultur 8 minggu, berat basah kalus dari eksplan tiler sebesar  $0,35 \pm 0,09$  g, sedangkan berat basah kalus dari eksplan *crown* hanya sebesar  $0,16 \pm 0,08$  g (Gambar 4.2). Ini menunjukkan adanya perbedaan pertumbuhan kalus yang sangat besar dari kedua eksplan, yaitu berat kalus dari eksplan tiler 2x lebih besar dibandingkan dengan berat kalus dari eksplan *crown*.

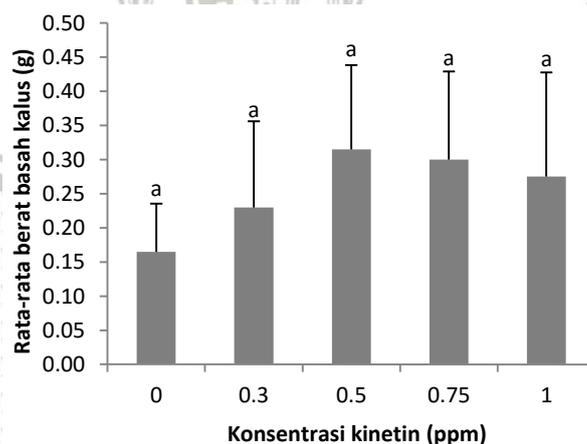


Gambar 4.1. Pembentukan dan pertumbuhan kalus dari eksplan *crown* dan eksplan tiler pada medium MS dengan penambahan kombinasi 2,4-D 0,75 ppm dan beberapa konsentrasi kinetin delapan minggu setelah kultur. A1 dan B1 tanpa kinetin (kontrol), A2 dan B2 kinetin 0,3 ppm, A3 dan B3 kinetin 0,5 ppm, A4 dan B4 kinetin 0,75 ppm, A5 dan B5 kinetin 1 ppm.



Gambar 4.2. Pengaruh jenis eksplan pada berat basah kalus dari tanaman akar wangi umur delapan minggu setelah kultur. Ket: huruf yang sama dari masing-masing batang menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji DMRT ( $\alpha=0,05$ )

Penambahan kinetin pada medium yang dikombinasikan dengan 2,4-D 0,75 ppm meningkatkan pertumbuhan kalus. Berat basah kalus pada medium yang mengandung 2,4-D saja hanya sebesar 0,17g, sedangkan pada medium yang mengandung 2,4-D 0,75 ppm yang dikombinasikan dengan kinetin 0,3-1 ppm berkisar antara 0,23 - 0,28 g. Pertumbuhan kalus terbaik terdapat pada medium kultur yang mengandung kinetin 0,5 ppm (Gambar 4.3). Namun demikian, berat basah kalus pada masing-masing perlakuan tidak berbeda nyata yang kemungkinan disebabkan oleh adanya variasi berat basah kalus yang sangat tinggi pada masing-masing perlakuan (Lampiran 1).



Gambar 4.3. Pengaruh konsentrasi kinetin yang dikombinasikan dengan 2,4-D 0,75 ppm pada medium terhadap berat basah kalus umur 8 minggu setelah kultur. Ket: huruf yang sama dari masing-masing batang menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji DMRT ( $\alpha=0,05$ )

Perbedaan kecepatan pembentukan dan pertumbuhan kalus pada eksplan *crown* dan tiler kemungkinan dipengaruhi oleh kondisi fisiologis dari masing-masing eksplan. Wilkins dan Dodds (1983) menyatakan bahwa kecepatan proliferasi sel-sel kalus sangat bervariasi dan salah satunya dipengaruhi oleh jenis dan sumber eksplan. Menurut Dodds dan Robert (1995), penggunaan organ yang berbeda menunjukkan kecepatan pembelahan yang berbeda. Perbedaan respon berbagai eksplan dalam induksi kalus telah dilaporkan, antara lain eksplan nodus lebih responsif daripada eksplan daun dan akar pada tanaman *Citrus jambhiri* (Savita dkk. 2010), eksplan hipokotil lebih responsif daripada eksplan kotiledon pada tanaman *Trigonella foenum Graecum* L. (ElNour dkk., 2015), dan kotiledon lebih responsif daripada eksplan akar pada tanaman *Ricinus communis* (Abd Elaleem dkk., 2015). Beberapa faktor seperti genotip tanaman, sumber eksplan, medium, dan zat pengatur tumbuh dalam medium dapat mempengaruhi pembentukan dan pertumbuhan kalus (Kumari dkk., 2015). Eksplan berupa jaringan muda pada umumnya lebih responsif dibandingkan dengan jaringan yang tua (Durrani dkk., 2017) dan eksplan dari jaringan yang aktif membelah memberikan respon pembentukan kalus lebih cepat dibandingkan dengan jaringan yang dorman (Zulkarnain, 2011).

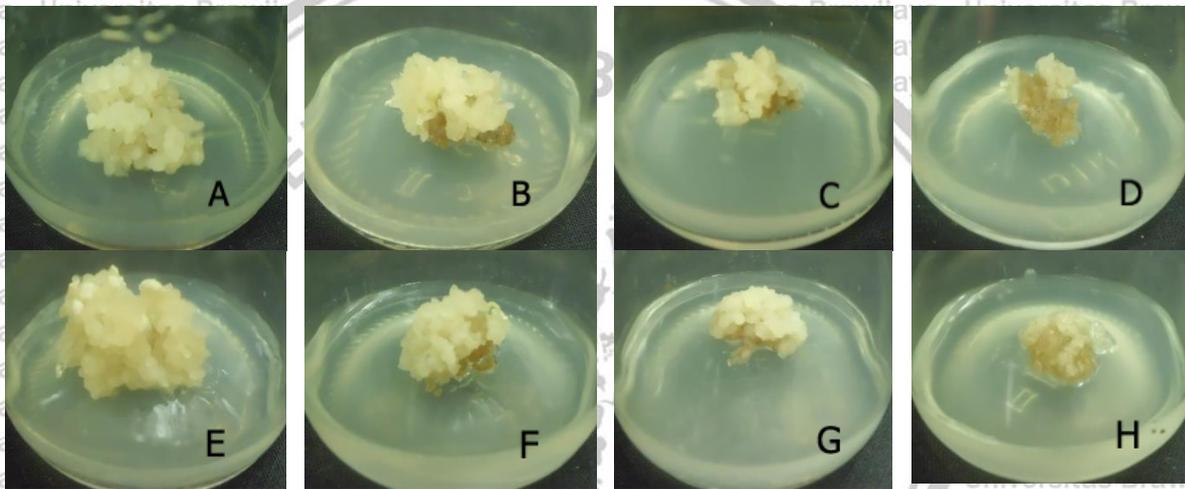
Selain dipengaruhi oleh jenis eksplan, lambatnya pembentukan dan pertumbuhan kalus pada eksplan *crown* diduga akibat adanya senyawa polifenol yang bersifat toksik. Yustina (2003) menyatakan bahwa metabolisme senyawa fenol memberikan efek toksik yang dapat menghambat pertumbuhan jaringan. Faktor lain yang diduga menyebabkan rendahnya tingkat pertumbuhan kalus dari eksplan *crown* dibandingkan tiler adalah adanya kandungan auksin endogen dalam *crown* yang lebih tinggi dibandingkan dengan tiler, karena letak *crown* lebih dekat dengan bagian akar yang kaya auksin. Penambahan auksin eksogen berupa 2,4-D pada medium kultur menyebabkan konsentrasi auksin pada eksplan *crown* meningkat tajam sehingga memberikan efek toksik pada eksplan. Toksisitas yang diakibatkan oleh kandungan auksin yang terlalu tinggi pada ekplan dapat menghambat pembelahan sel sehingga terjadi penurunan pertumbuhan kalus (Wattimena, 1988).

Keberhasilan pembentukan kalus juga sangat ditentukan oleh jenis dan konsentrasi zat pengatur tumbuh. Kinetin merupakan salah satu zat pengatur tumbuh sitokinin yang sering dikombinasikan dengan auksin dalam memacu pembentukan kalus (George, 1993). Kinetin dapat merangsang pembelahan sel dan mempengaruhi perkembangan fisiologi sel (Taiz & Zeiger, 1991). Penambahan kinetin mampu menginduksi kalus dari eksplan daun tanaman *Talinum paniculatum* (Wardani dkk., 2004) dan eksplan ujung pucuk tanaman *Shorgum bicolor* (Amali dkk., 2014).

#### 4.2 Pengaruh Pemberian Elisitor Ion Logam (Cd, Al, Pb) dan Karbohidrat (Pektin, Kitosan, Arabic Gum) pada Medium Kultur terhadap Pertumbuhan Kalus dari Tanaman Akar Wangi

Penambahan elisitor ion logam (Al, Cd, dan Pb) atau karbohidrat (pektin, kitosan, arabic gum) pada medium kultur berpengaruh terhadap pertumbuhan kalus akar wangi.

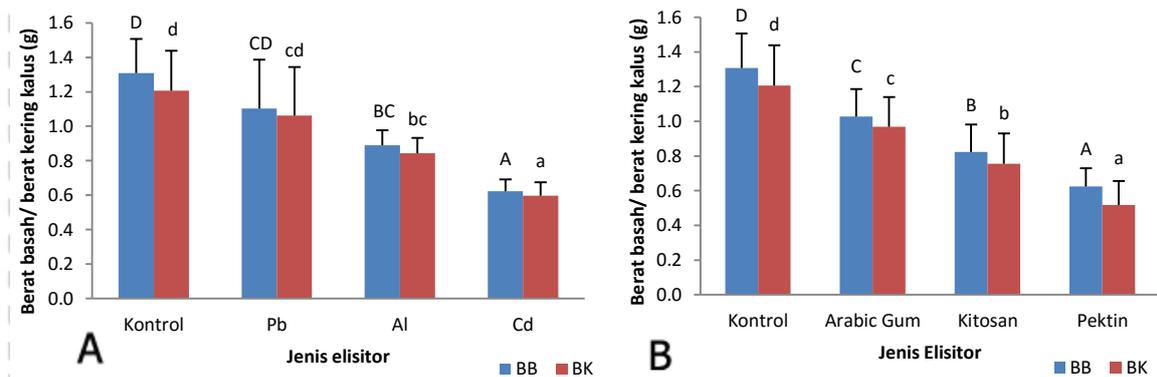
Sel-sel kalus pada medium kontrol tanpa elisitor tumbuh merata pada seluruh permukaan eksplan, sedangkan sel-sel kalus baru pada medium dengan penambahan Pb, Al, arabic gum, atau kitosan hanya terdapat pada beberapa bagian permukaan eksplan. Bahkan pada media dengan penambahan Cd atau pektin, kalus terbentuk hanya pada sebagian kecil dari permukaan eksplan (Gambar 4.4).



Gambar 4.4. Pertumbuhan kalus akar wangi umur delapan minggu setelah dielisitasi dengan ion logam 0.1 mM dan karbohidrat 100 ppm. (A) dan (E) Kontrol (B) Pb (C) Al (D) Cd (F) Arabic gum (G) Kitosan (H) Pektin.

Pertumbuhan kalus pada medium kultur dengan penambahan elisitor ion logam atau karbohidrat lebih rendah dibandingkan dengan pertumbuhan kalus pada media kontrol tanpa elisitor. Rata-rata berat basah kalus pada media kontrol tanpa elisitor sebesar 1,31 g, sedangkan rata-rata berat basah kalus pada media yang mengandung ion logam adalah 0,62 - 1,10 g dan rata-rata berat basah kalus pada media yang mengandung karbohidrat adalah 0,62 - 1,03 g. Pada media kontrol tanpa elisitor, rata-rata berat kering kalus mencapai 1,21 g, sedangkan rata-rata berat kering kalus pada medium yang mengandung ion logam hanya 0,60 - 1,06 g dan rata-rata berat kering kalus pada medium yang mengandung karbohidrat adalah 0,52 - 0,97 g. Pada konsentrasi yang sama, tiap-tiap elisitor ion logam atau

karbohidrat memiliki tingkat penghambatan pertumbuhan yang berbeda. Tingkat hambatan pertumbuhan kalus dari yang tertinggi hingga terendah adalah perlakuan Cd, Al, dan Pb. Pada elisitasi dengan karbohidrat, urutan penghambatan pertumbuhan kalus dari yang tertinggi hingga terendah yaitu perlakuan pektin, kitosan, dan Arabic gum (Gambar 4.5).



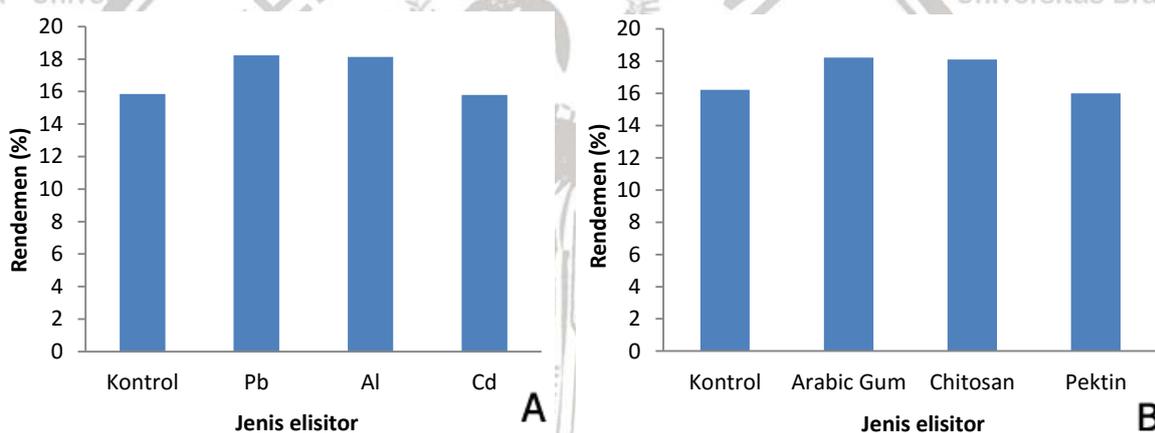
Gambar 4.5. Berat basah dan berat kering kalus akar wangi umur delapan minggu setelah elisitasi. (A) Ion logam 0,1 mM (B) Karbohidrat 100 ppm. Ket: huruf yang sama dari masing-masing warna batang menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji DMRT ( $\alpha=0,05$ )

Penurunan berat basah dan berat kering pada kalus perlakuan elisitasi dapat disebabkan oleh adanya penghambatan pembelahan sel. Menurut Akula & Gokare (2011), aktivitas elisitor juga mampu menghambat pembelahan sel dan mengalihkan metabolisme sel. Mekanisme penghambatan pembelahan sel oleh elisitor terjadi dengan tidak terbentuknya mikrotubul dan terhambatnya aktivitas histon H1 kinase saat sintesis DNA. Sedangkan pengalihan metabolisme sel terjadi melalui perubahan proses yang awalnya sel mensintesis metabolit primer untuk pertumbuhan kemudian sel beralih mensintesis metabolit sekunder sebagai respon pertahanan diri.

Perbedaan penghambatan pertumbuhan pada kalus perlakuan elisitasi kemungkinan disebabkan oleh adanya perbedaan tingkat toksisitas dan keasaman di antara masing-masing elisitor. Berdasarkan tingkat toksisitasnya, ion logam Cd mempunyai toksisitas yang paling tinggi di antara elisitor ion logam lainnya. Sedangkan berdasarkan tingkat keasamannya, Pb memiliki sifat basa. Pada elisitor karbohidrat, kitosan bersifat basa dan nontoksik, sedangkan pektin bersifat netral atau sedikit asam.

### 4.3 Pengaruh Pemberian Elisitor Ion Logam (Cd, Al, Pb) dan Karbohidrat (Pektin, Kitosan, Arabic Gum) pada Medium Kultur terhadap Kandungan *Vetiver Oil* Kalus dari Tanaman Akar Wangi

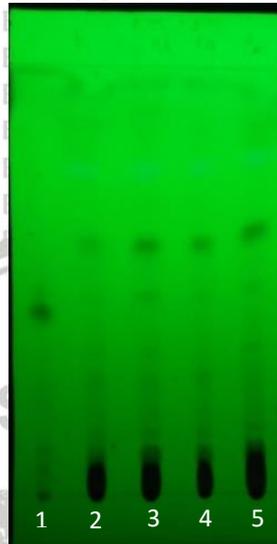
Pemberian elisitor ion logam atau karbohidrat pada media kultur berpengaruh terhadap rendemen *vetiver oil* kalus akar wangi. Elisitor ion logam Pb dan Al atau kitosan dan arabic gum meningkatkan rendemen *vetiver oil* sebesar 2%. Rendemen *vetiver oil* pada kalus tanpa elisitor sekitar 16%, sedangkan rendemen *vetiver oil* pada kalus hasil elisitasi dengan Pb, Al, arabic gum, dan kitosan sekitar 18%. Pada elisitasi dengan ion logam, rendemen *vetiver oil* terendah diperoleh dari media dengan penambahan Cd, yaitu 15,8% (Gambar 4.6 A, Lampiran 2). Pada media dengan penambahan elisitor karbohidrat, rendemen *vetiver oil* yang dihasilkan pada kalus hasil elisitasi dengan pektin sama dengan rendemen pada kalus kontrol, yaitu sebesar 16% (Gambar 4.6 B, Lampiran 2).



Gambar 4.6. Rendemen *vetiver oil* kalus akar wangi hasil perlakuan elisitasi dengan ion logam dan karbohidrat. (A) Ion logam dan (B) Karbohidrat

Identifikasi komponen kimia *vetiver oil* diawali dengan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Analisis dengan metode KLT bertujuan untuk deteksi awal keberadaan komponen kimia *vetiver oil*. Hasil pengamatan pada plat KLT dengan sinar UV 254 nm terlihat spot-spot yang menunjukkan keberadaan komponen penyusun *vetiver oil*. Di antara senyawa tersebut terdapat tiga senyawa yang bersesuaian dengan standar *vetiver oil*, masing-masing ditunjukkan dengan nilai Rf 0,14; 0,39; dan 0,72. Adanya kesamaan nilai Rf antara sampel dan standar *vetiver oil* ini dapat memberikan informasi awal tentang adanya komponen kimia *vetiver oil* pada ekstrak minyak dari kalus hasil perlakuan elisitasi

dengan ion logam. Hal ini menunjukkan bahwa pada ekstrak *vetiver oil* dari kalus hasil perlakuan elisitasi terkandung komponen penyusun *vetiver oil*. Dengan demikian, hasil identifikasi KLT menunjukkan bahwa hasil isolasi minyak atsiri dari kalus akar wangi positif mengandung senyawa golongan terpenoid (Gambar 4.7).



Gambar 4.7 KLT dari ekstrak *vetiver oil* pada kalus akar wangi hasil elisitasi dengan ion logam delapan minggu setelah kultur. Keterangan = 1: Standar, 2: Kontrol, 3: Al, 4: Cd, 5: Pb.

Hasil GC-MS pada kultur kalus dari tanaman akar wangi kontrol dan hasil elisitasi dengan ion logam teridentifikasi adanya 27 komponen, antara lain Naphthalene, Tridecane, Benzothiazole, (1-Methyl-Penta-2,4-Dienyl)-Benzene, Hexadecane, Heptadecane, Vanilin, 9-Octadecenoic Acid (Z)-(CAS) Oleic Acid, 2,5 Dimethoxy/Thermophylline-1,4-Benzoguinone, Vetiverol, Apha Sinensal, dan Alpha Amorphene (Tabel 4.1).

Pemberian elisitor ion logam pada medium kultur berpengaruh terhadap jumlah komponen kimia dari kalus akar wangi. Pada kultur kalus kontrol terdapat 14 komponen (14 puncak) (Gambar 4.8 A). Pada kultur kalus hasil elisitasi dengan ion logam Pb menunjukkan adanya 15 komponen (15 puncak). Di antara komponen-komponen tersebut ada 6 komponen yang terdeteksi pada kalus hasil elisitasi dengan Pb namun tidak terdeteksi pada kalus kontrol. Masing-masing dari keenam komponen tersebut muncul pada R.time 16,7; 19,9; 29,1; 33,1; 34,2; dan 36,9 dan nama komponen tersebut berturut-turut adalah (1-Methyl-Penta-2,4-Dienyl)-Benzene, Heptadecane, Benzene 1,1'-(Ethoxymethylene),4-Tert-Butyl-2-(1-Methyl-2-Nitro-Ethyl)-Cyclohexanone, Myristic Acid, dan pentadecanoic acid (Gambar 4.8 B, Tabel 4.1). Pada kultur kalus hasil elisitasi

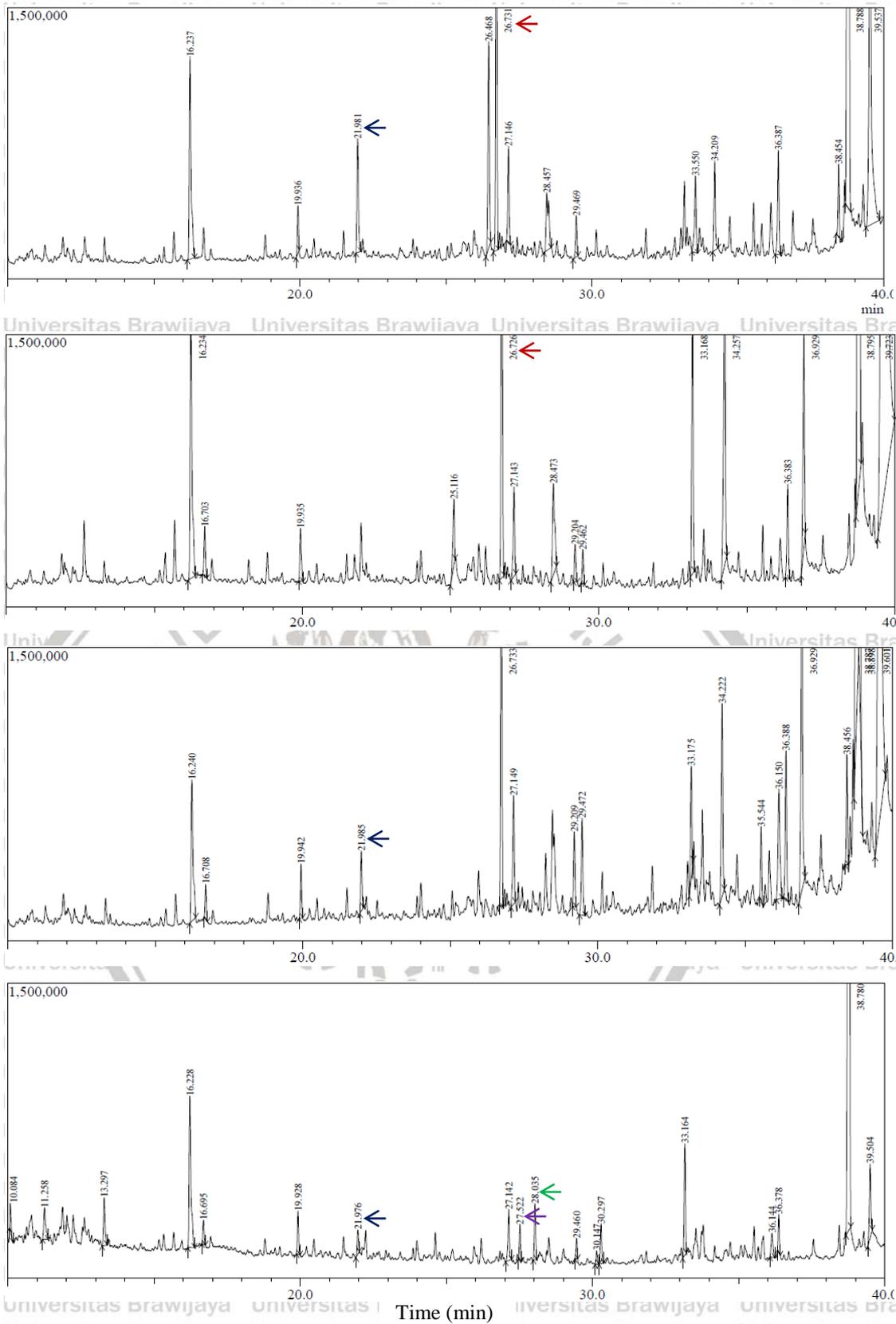
dengan ion logam Al dan Cd, masing-masing terdapat 18 komponen (18 puncak).

Di antara komponen-komponen kimia tersebut terdapat 6 komponen pada kalus hasil elisitasi dengan Al yang tidak terdeteksi pada kalus kontrol. Masing-masing dari keenam komponen muncul pada R. time 29,1; 29,4; 33,1; 36,1; 36,9; dan 38,4 dengan nama masing-masing komponen tersebut adalah Benzene 1,1'- (Ethoxymethylene), Phenyl – Methane - 1,1 – Diol Di - N-Butanoate, 4-Tert-Butyl-2-(1-Methyl-2-Nitro-Ethyl) Cyclohexanone, D-Galactit, pentadecanoic acid, dan eicosane (Gambar 4.8 C, Tabel 4.1).

Pada kultur kalus hasil elisitasi dengan ion logam Cd terdapat 9 komponen yang tidak terdeteksi pada kalus kontrol dan beberapa di antaranya muncul pada R.time 10,08 hingga 13,30. Di antara 9 komponen tersebut ada 2 komponen yang tidak terdeteksi pada perlakuan lainnya, yaitu alpha sinensal dan alpha amorphene yang masing-masing muncul pada R.time 27,5 dan 28 (Gambar 4.8 D, Tabel 4.1)

Hasil kromatogram kultur kalus menunjukkan adanya 4 senyawa bioaktif yang tergolong *vetiver oil*, yaitu vetiverol, vanillin, alpha sinensal dan alpha amorphene. Vetiverol memiliki rumus molekul  $C_{15}H_{24}O$  dengan berat molekul 220 dan vanilin memiliki rumus  $C_8H_8O_3$  dengan berat molekul 152. Rumus molekul alpha sinensal dan alpha amorphene berturut-turut yaitu  $C_{15}H_{22}O$  dan  $C_{15}H_{24}$ . Masing-masing dari kedua senyawa tersebut memiliki berat molekul 218 dan 204 (Tabel 4.1).

Pada kalus kontrol tanpa elisitor ion logam terkandung 2 komponen *vetiver oil*, yaitu vetiverol dan vanillin. Pada kalus hasil elisitasi dengan ion logam Pb hanya terdeteksi 1 komponen *vetiver oil*, yaitu vetiverol. Meskipun demikian, vetiverol yang terkandung pada kalus hasil elisitasi dengan ion logam Pb memiliki kelimpahan paling tinggi dibandingkan dengan kontrol dan perlakuan lainnya. Kandungan vetiverol pada kalus hasil elisitasi dengan ion logam Pb sebesar 4.37%, sedangkan kandungan vetiverol pada kalus kontrol tanpa elisitor hanya 3.99%. sebagaimana kalus kontrol, pada kalus hasil elisitasi dengan ion logam Al juga mengandung vetiverol dan vanillin, sedangkan pada kalus hasil elisitasi dengan ion logam Cd tidak terdapat vetiverol. Namun demikian, pada kalus hasil elisitasi dengan ion logam Cd terdapat komponen lain berupa alpha sinensal dan alpha amorphene yang tidak terdeteksi pada kalus kontrol maupun perlakuan lainnya. Kalus hasil elisitasi dengan ion logam Cd mengandung vanillin paling rendah dibandingkan dengan kontrol dan perlakuan lainnya, yaitu 0,23%, sedangkan kandungan vanillin terbesar terdapat pada kalus kontrol dengan kelimpahan sebesar 1,09%. Kandungan alpha sinensal dan alpha amorphene yang hanya terdeteksi pada kalus hasil elisitasi dengan Cd berturut-turut adalah 0,17 dan 0,51% (Tabel 4.2).



Gambar 4.8 Kromatogram GC-MS *vetiver oil* yang diperoleh dari kalus akar wangi hasil perlakuan elisitasi dengan ion logam. (A) Kontrol, (B) Pb, (C) Al, (D) Cd.

Keterangan: ← = vetiverol ← = vanillin ← = alpha sinensal ← = alpha amorphene

Tabel 4.1 Komponen kimia hasil analisis GC-MS dari ekstrak (n-heksana) kalus kontrol dan hasil elisitasi dengan ion logam

No	Nama Senyawa	Rumus Molekul	Berat Molekul	R.Time
1	Naphthalene	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub>	138	11.2
2	Tridecane	C <sub>14</sub> H <sub>30</sub>	198	13.2
3	Benzothiazole	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> NS	135	16.2
4	(1-Methyl-Penta-2,4-Dienyl)-Benzene	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub>	158	16.6; 16,7
5	Hexadecane	C <sub>16</sub> H <sub>34</sub>	226	19.9; 27,1; 33,5; 38,4
6	Heptadecane	C <sub>21</sub> H <sub>44</sub>	296	19.9
7	Vanilin*	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	152	21.9
8	9-Octadecenoic Acid (Z)- (CAS) Oleic Acid	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	282	25.1
9	2,5Dimethoxy/Thermophylline-1,4-Benzoguinone	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	168	26.4
10	Vetiverol*	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	220	26.7
11	Apha Sinensal*	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O	218	27.5
12	Alpha Amorphene*	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204	28
13	Dodecanamide, N,N-Bis(2-Hydroxyethyl)	C <sub>16</sub> H <sub>33</sub> NO <sub>3</sub>	287	28.4
14	Benzene, 1,1'-(Ethoxymethylene)	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O	212	29.1
15	Propanoic Acid	C <sub>16</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub>	286	29.4
16	Phenyl-Methane-1,1-Diol Di-N-Butanoate	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>	264	29.4
17	3-(Hydroxy-Phenyl-Methyl)-3,4-Dimethyl-1-Phenyl-Pentan-2-One	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	296	29.4
18	Dodecane, 2,6,10-Trimethyl- (CAS) Farnesane	C <sub>15</sub> H <sub>32</sub>	212	30.1
19	4-Tert-Butyl-2-(1-Methyl-2-Nitro-Ethyl)-Cyclohexanone	C <sub>13</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>3</sub>	241	33.1
20	Tetradecanoic Acid (CAS) Myristic Acid	C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	228	34.2
21	3-Eicosene	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub>	280	35.5
22	Octadecanoic Acid (CAS) Stearic Acid	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	284	36.1
23	D-Galactit	C <sub>14</sub> H <sub>30</sub> O <sub>6</sub>	294	36.1
24	1,2-Benzenedicarboxylic Acid	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O	78	36.3; 38,7
25	Eicosane	C <sub>15</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	242	38.4
26	Pentadecanoic Acid	C <sub>20</sub> H <sub>42</sub>	282	36.9; 39,5; 39,7
27	Hexadecanoic Acid (CAS) Palmitic Acid	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	256	39.6

Ket: \* = senyawa bioaktif yang tergolong dalam *vetiver oil*

Tabel 4.2 Kandungan *vetiver oil* kalus hasil elisitasi dengan ion logam Pb, Al, Cd 0,1mM umur 8 minggu

No	Nama Senyawa	Kandungan pada masing-masing perlakuan (%)			
		Kontrol	Pb	Al	Cd
1	Vetiverol*	3.99	4.37	3.59	-
2	Apha Sinensal*	-	-	-	0.17
3	Alpha Amorphene*	-	-	-	0.51
4	Vanillin	1.09	-	0.53	0.23

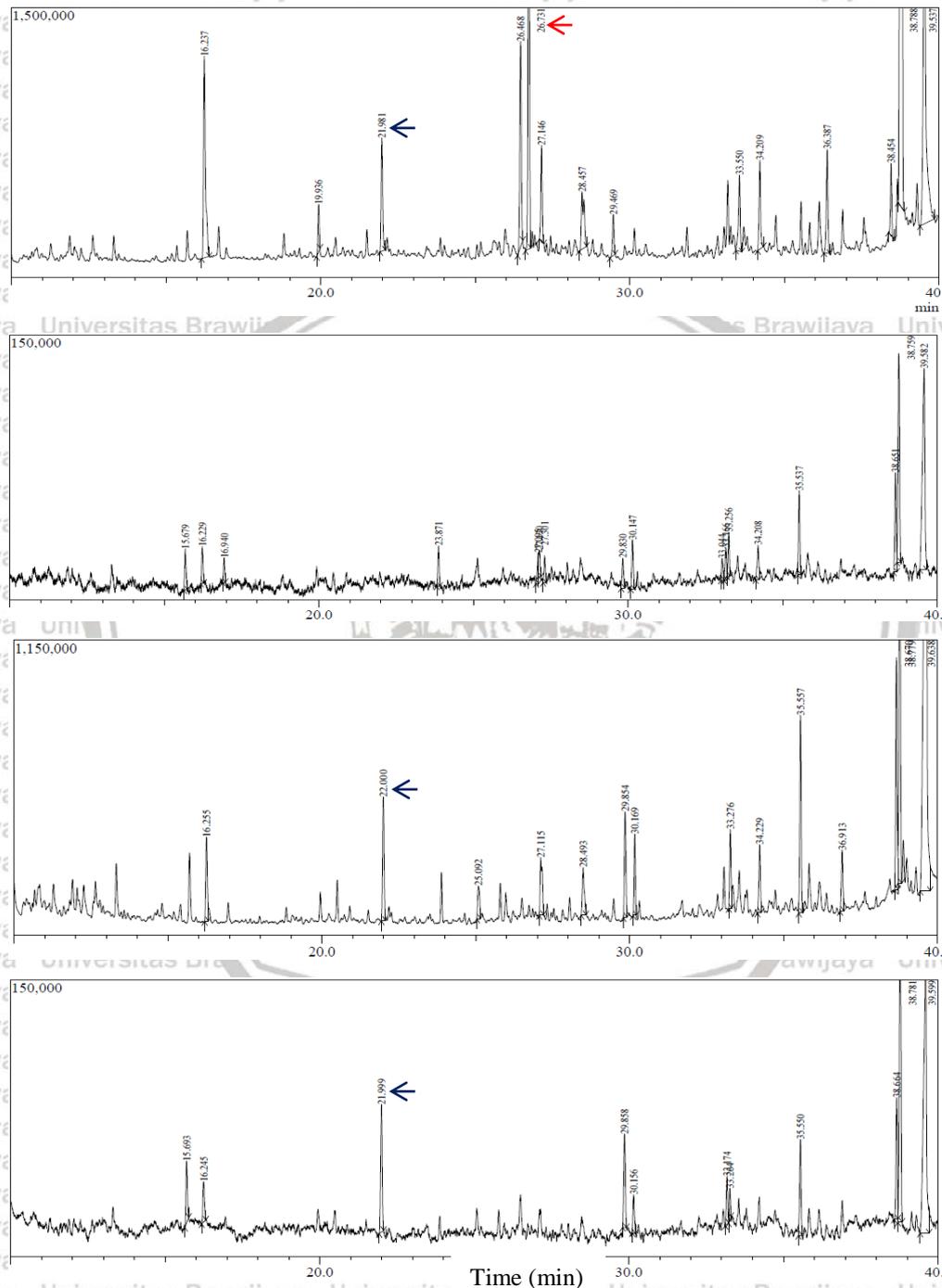
Ket: \* = komponen utama *vetiver oil*

Kultur kalus dari tanaman akar wangi mampu menghasilkan beberapa senyawa *vetiver oil*, di antara senyawa *vetiver oil* yang dihasilkan tersebut terdapat tiga komponen utama penyusun *vetiver oil*, yaitu *vetiverol*, *alpha sinensal* dan *alpha amorphene*. Sebagai salah satu komponen utama *vetiver oil*, *vetiverol* merupakan *finger print* dalam penentuan kualitas *vetiver oil*. Semakin tinggi kadar *vetiverol* yang terkandung dalam suatu minyak, maka kualitas minyaknya semakin bagus (Kadarohman, dkk., 2014).

Adanya peningkatan kandungan *vetiverol* pada kalus hasil elisitasi dengan ion logam Pb menunjukkan bahwa elisitor ion logam Pb mampu meningkatkan aktivitas enzim yang berperan dalam sintesis *vetiverol*. Sebaliknya, tidak terdeteksinya *vanillin* pada kalus hasil elisitasi dengan ion logam Pb menunjukkan bahwa elisitor ion logam Pb dapat menyebabkan inaktivasi aktivitas enzim yang berperan dalam sintesis *vanillin*. Kandungan *vetiverol* dan *vanillin* pada hasil elisitasi dengan ion logam Al lebih rendah dibandingkan dengan kalus kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa elisitor ion logam mampu menghambat aktivitas enzim yang berperan dalam sintesis *vanillin*. Penghambatan aktivitas enzim yang berperan dalam sintesis *vanillin* ini juga dapat disebabkan oleh elisitor ion logam Cd. Namun demikian, elisitor ion logam Cd mampu mengaktifkan aktivitas enzim yang berperan dalam sintesis *alpha sinensal* dan *alpha amorphene*.

Hasil GC-MS pada kultur kalus dari tanaman akar wangi kontrol dan hasil elisitasi dengan karbohidrat teridentifikasi adanya 26 komponen, antara lain dari 4-Hexenoic Acid, Benzothiazole, Decane, Hexadecane, Vanilin, Tridecane, 2-Nonyl-1-ol, dan lain-lain (Tabel 4.1). Pada kultur kalus hasil elisitasi dengan arabic gum menunjukkan adanya 17 komponen (17 puncak). Di antara komponen-komponen tersebut ada 11 komponen yang tidak terdeteksi pada kalus kontrol, masing-masing muncul pada R.time 15,6; 16,9; 23,8; 27; 27,3; 29,8; 33,1; 33,2; 33,5; 38,6; dan 39,5 serta nama komponen tersebut berturut-turut adalah 4-Hexenoic Acid, Decane, Tridecane, Undecane, Dodecanoic Acid, 7-Hexadecene, 4-Tert-Butyl-2-(1-Methyl-2-Nitro-Ethyl)-Cyclohexanone, Tetradecanoic Acid, 5-Octadecene, Hexadecanoic Acid, dan Palmitic Acid (Gambar 4.9 B, Tabel 4.2). Pada kultur kalus hasil elisitasi dengan kitosan menunjukkan adanya 13 komponen (13 puncak). Di antara komponen-komponen tersebut ada 7 komponen yang tidak terdeteksi pada kalus kontrol, masing-masing muncul pada R.time 25; 27,1; 30,1; 33,2; 35,5; 38,6; dan 39,5 serta nama komponen tersebut berturut-turut adalah 2-Nonyl-1-ol, Undecane, Dodecane, Tetradecanoic Acid, 5-Octadecene, Pentadecanoic Acid, Hexadecanoic Acid, dan Palmitic Acid (Gambar 4.9 C, Tabel 4.2). Pada kultur kalus hasil elisitasi dengan pektin menunjukkan adanya 11 komponen (11 puncak). Di antara komponen-komponen

tersebut ada 7 komponen yang tidak terdeteksi pada kalus kalus kontrol, masing-masing muncul pada R.time 15,6; 29,8; 33,1; 33,2; 35,5; 38,6; dan 39,5 serta nama komponen tersebut berturut-turut adalah 4-Hexenoic Acid, 1,3-Benzodioxol, 4-Tert-Butyl-2-(1-Methyl-2-Nitro-Ethyl)-Cyclohexanone, Tetradecanoic Acid, 5-Octadecene, Hexadecanoic Acid, dan Palmitic Acid (Gambar 4.9 D, Tabel 4.3).



Gambar 4.9 Kromatogram GC-MS *vetiver oil* yang diperoleh dari kalus akar wangi hasil perlakuan elisitasi dengan karbohidrat. (A) Kontrol, (B) Arabic gm, (C) Kitosan, (D) Pektin.

Keterangan:   
← = vetiverol   
← = vanillin

Tabel 4.3 Komponen kimia hasil analisis GC-MS dari ekstrak (n-heksana) kalus kontrol dan hasil elisitasi dengan karbohidrat

No	Nama Senyawa	Rumus Molekul	Berat Molekul	R. Time
1	4-Hexenoic Acid, 2,2,5-Trimethyl-, Ethyl Ester	$C_{12}H_{24}O$	184	15.6
2	Benzothiazole	$C_7H_5NS$	135	16.2
3	Decane	$C_{13}H_{28}$	184	16.9
4	Hexadecane	$C_{16}H_{34}$	226	19.9; 27.1; 30.1; 33.5; 38.4
5	Vanilin*	$C_8H_8O_3$	152	21.9
6	Tridecane	$C_{14}H_{30}$	198	23.8
7	2-Nonyn-1-Ol	$C_9H_{18}O$	142	25
8	2,5Dimethoxy / Thermophylline-1,4-Benzoguinone	$C_8H_8O_4$	168	26.4
9	Vetiverol*	$C_{15}H_{24}O$	220	26.7
10	Undecane	$C_{13}H_{28}$	184	27
11	Pentadecane	$C_{15}H_{32}$	212	27.1
12	Dodecane	$C_{15}H_{32}$	212	27.1; 30.1
13	Dodecanoic Acid, Methyl Ester	$C_{13}H_{26}O_2$	214	27.3
14	Dodecanamide, N,N-Bis(2-Hydroxyethyl)	$C_{16}H_{33}NO_3$	287	28.4
15	Propanoic Acid	$C_{16}H_{30}O_4$	286	29.4
16	7-Hexadecene	$C_{16}H_{32}$	224	29.8
17	1,3-Benzodioxol, 5-Hydroxymethyl-6-Nitro	$C_8H_7NO_5$	197	29.8
18	4-Tert-Butyl-2-(1-Methyl-2-Nitro-Ethyl)-Cyclohexanone	$C_{13}H_{23}NO_3$	241	33.1
19	Tetradecanoic Acid, Methyl Ester	$C_{15}H_{30}O_2$	242	33.2
20	Tetradecanoic Acid (CAS) Myristic Acid	$C_{14}H_{28}O_2$	228	34.2
21	5-Octadecene	$C_{18}H_{36}$	252	35.5
22	Pentadecanoic Acid (CAS) Pentadecylic Acid	$C_{15}H_{30}O_2$	242	36.9
23	Hexadecanoic Acid, Methyl Ester	$C_{17}H_{34}O_2$	270	38.6
24	1,2-Benzenedicarboxylic Acid, Dibutyl Ester	$C_{16}H_{22}O_4$	278	38.7
25	Hexadecanoic Acid (CAS) Palmitic Acid	$C_{16}H_{32}O_2$	256	39.5
26	Pentadecanoic Acid	$C_{20}H_{42}$	282	39.5

Ket: \* = senyawa bioaktif yang tergolong dalam *vetiver oil*

Pada kalus hasil elisitasi dengan karbohidrat terdapat satu komponen *vetiver oil* berupa vanillin, kecuali pada kalus hasil elisitasi dengan Arabic gum. Pada kalus hasil elisitasi dengan Arabic gum tidak terdapat komponen *vetiver oil*, namun mengandung senyawa bioaktif lainnya yang tidak tergolong *vetiver oil*. Kandungan vanillin dari yang tertinggi hingga terendah terdapat pada kalus hasil elisitasi dengan pektin (2,87%), kitosan (1,75%), dan kalus kontrol (1,09%) (Tabel 4.4).

Tabel 4.4 Kandungan *vetiver oil* kalus hasil elisitasi dengan karbohidrat 100 ppm umur 8 minggu

No	Nama Senyawa	Kandungan pada masing-masing perlakuan (%)			
		Kontrol	Arabic gum	Kitosan	Pektin
1	Vetiverol*	3.99	-	-	-
2	Vanilin	1.09	-	1.746	2.874

Ket: \* = komponen utama *vetiver oil*

Kandungan vanilin pada kalus hasil elisitasi dengan pektin dan kitosan lebih tinggi dibandingkan dengan kalus kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa elisitor pektin dan kitosan mampu meningkatkan aktivitas enzim yang berperan dalam sintesis vanillin. Sebaliknya, pada kalus hasil elisitasi dengan Arabic gum tidak mengandung vanillin. Hal ini menunjukkan bahwa elisitor Arabic gum dapat menonaktifkan aktivitas enzim yang berperan dalam sintesis vanilin. Pada kalus hasil elisitasi dengan ketiga jenis elisitor karbohidrat berupa pektin, kitosan, dan Arabic gum tidak mengandung vetiverol. Hal ini menunjukkan bahwa ketiga jenis elisitor karbohidrat tersebut menyebabkan inaktivasi aktivitas enzim yang berperan dalam sintesis vetiverol.

Berdasarkan proses biosintesisnya, minyak atsiri terbagi menjadi dua golongan, yaitu terpenoid dan senyawa aromatik (Agusta, 2000). Terpenoid bersifat volatile dan banyak ditemukan sebagai komponen minyak atsiri dan salah satunya berupa seskuiterpen yang tersusun oleh tiga unit isopren (C<sub>15</sub>) (Raharjo, 2013). Salah satu senyawa kimia yang dihasilkan dari turunan seskuiterpen adalah fitoaleksin. Pada proses elisitasi, fitoaleksin dihasilkan oleh sel-sel sehat yang berdekatan dengan sel-sel rusak atau nekrotik sebagai salah satu mekanisme dalam menghadapi cekaman (Agrios, 1997).

Keberhasilan elisitasi dalam memacu sintesis senyawa metabolit sekunder dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain jenis elisitor, konsentrasi elisitor, lama kontak elisitor, waktu penambahan elisitor dan fase pertumbuhan sel, serta nutrisi yang ditambahkan pada media kultur (Pandiangan, 2011). Tiap-tiap jenis elisitor memberikan respon spesifik dalam memacu terbentuknya metabolit sekunder. Hal ini dipengaruhi oleh interaksi antara kultur sel dengan elisitor (Vasconsuelo & Boland, 2007). Elisitor dapat menyebabkan terjadinya depolarisasi membran melalui aktivasi saluran ion. Elisitor yang diinjeksikan secara langsung ke dalam sel, bereaksi dengan membran plasma sel membentuk ikatan kompleks dengan protein dinding sel yang mengakibatkan terjadinya perubahan konformasi kemudian memicu aktivitas gen yang berperan dalam sistem pertahanan diri dan biosintesis metabolit sekunder (Taiz dan Zeiger, 2002). Selain itu, elisitor juga mampu membentuk pori sehingga memungkinkan ion untuk menembus

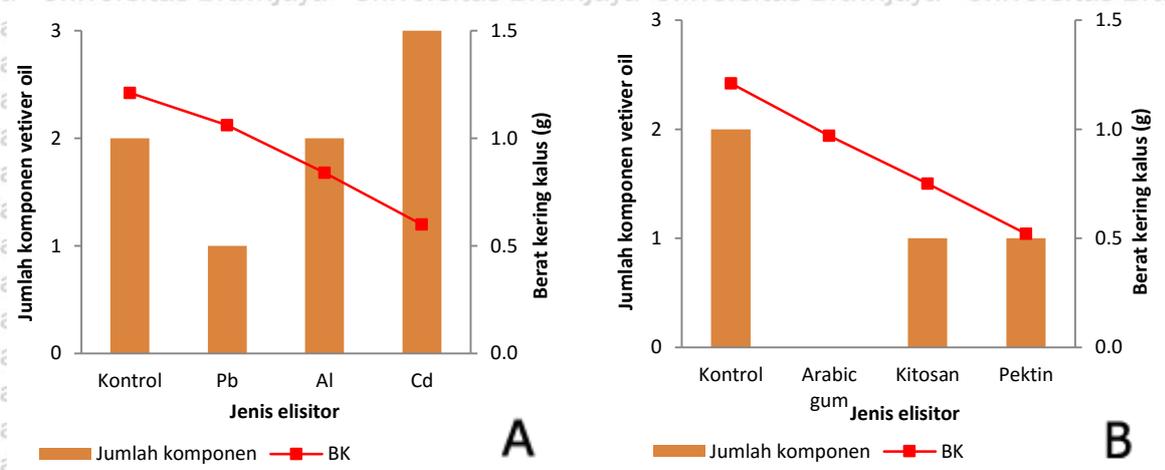
membran tanpa adanya pengikatan oleh reseptor terlebih dahulu (Kluasener dan Weiler, 1999).

#### 4.4 Korelasi antara Pertumbuhan Kalus dengan Kandungan Kimia *Vetiver Oil* Akar Wangi

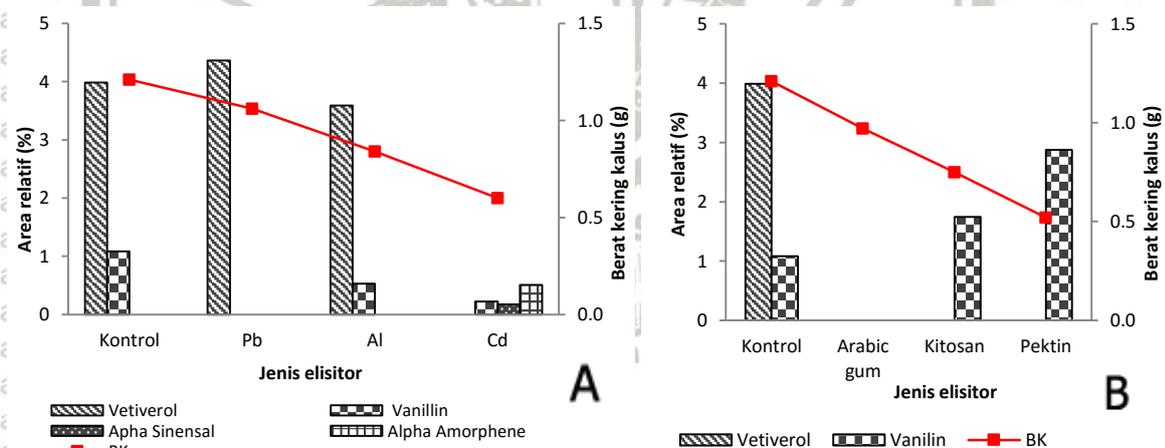
Pengaruh elisitor terhadap pertumbuhan, jumlah komponen, dan kandungan *vetiver oil* kalus akar wangi tergantung dari jenis elisitor yang ditambahkan pada medium kultur. Pada kalus hasil elisitasi dengan ion logam, semakin rendah berat kering kalus maka jumlah komponen *vetiver oil*nya cenderung semakin banyak. Kalus hasil elisitasi dengan ion logam Pb mempunyai berat kering lebih tinggi dan jumlah komponen *vetiver oil* paling sedikit dibandingkan dengan kalus hasil perlakuan elisitasi lainnya, yaitu hanya ada 1 komponen. Sebaliknya, dengan berat kering paling rendah, kalus hasil elisitasi dengan ion logam Cd memiliki jumlah komponen *vetiver oil* paling banyak dibandingkan dengan kalus kontrol dan hasil perlakuan elisitasi lainnya, yaitu terdapat 3 komponen (Gambar 4.10 A). Berbeda dengan ion logam, pada kalus hasil elisitasi dengan karbohidrat, semakin rendah berat kering kalus maka jumlah komponen *vetiver oil*nya cenderung semakin sedikit, kecuali pada kalus hasil elisitasi dengan arabic gum. Jumlah komponen *vetiver oil* pada kalus hasil elisitasi dengan pektin sama dengan kalus hasil elisitasi dengan kitosan, yaitu 1 komponen, (Gambar 4.10 B). Namun demikian, baik pada perlakuan elisitasi dengan ion logam maupun karbohidrat tidak ada korelasi antara berat kering kalus dengan jumlah komponen *vetiver oil*nya (Lampiran 1).

Pada kalus hasil elisitasi dengan ion logam, semakin rendah berat kering kalus maka kandungan *vetiver oil*nya cenderung semakin rendah, kecuali pada kalus hasil elisitasi dengan ion logam Pb. Kalus hasil elisitasi dengan ion logam Pb tidak mengandung vanillin, namun mengandung *vetiverol* lebih tinggi daripada kalus kontrol dan perlakuan elisitasi lainnya. Selain itu, dengan berat kering paling rendah, kalus hasil elisitasi dengan ion logam Cd mengandung *alpha sinensal* dan *alpha amorphene* yang tidak terdapat pada kalus kontrol maupun kalus hasil perlakuan elisitasi lainnya. (Gambar 4.11 A). Pada kalus hasil elisitasi dengan karbohidrat, semakin rendah berat kering kalus maka kandungan vanilin cenderung semakin tinggi, sedangkan kandungan *vetiverol*nya cenderung semakin rendah. Namun, dengan berat kering yang lebih tinggi daripada perlakuan elisitasi lainnya, kalus hasil elisitasi dengan arabic gum tidak menghasilkan vanillin (Gambar 4.11 B). Baik pada

perlakuan elisitasi dengan ion logam maupun karbohidrat tidak ada korelasi antara berat kering kalus dengan kandungan *vetiver oil*-nya (Lampiran 1).



Gambar 4.10 Korelasi antara berat kering dengan jumlah komponen *vetiver oil* pada kalus hasil elisitasi dengan ion logam dan karbohidrat. (A) Ion logam dan (B) Karbohidrat



Gambar 4.11 Korelasi antara berat kering dengan kandungan *vetiver oil* pada kalus hasil elisitasi dengan ion logam dan karbohidrat. (A) Ion logam (B) Karbohidrat

Biosintesis metabolit sekunder sering dikaitkan dengan pertumbuhan tanaman. Sintesis metabolit sekunder pada kultur kalus saat fase stasioner umumnya lebih tinggi daripada saat fase logaritmik. Adanya peningkatan kandungan vanillin pada kalus hasil elisitasi dengan karbohidrat dapat dipengaruhi oleh penurunan aktivitas pembelahan sel yang mengakibatkan penghambatan pertumbuhan. Hal ini didukung oleh beberapa hasil penelitian sebelumnya yang menyebutkan bahwa peningkatan sintesis metabolit sekunder

umumnya diikuti dengan penurunan proses pertumbuhan. Hasil penelitian Aisyah (2007) menyebutkan bahwa sel kalus akan menghasilkan senyawa metabolit sekunder saat mengalami penurunan aktivitas sel. Penurunan aktifitas sel umumnya terjadi pada fase stasioner. Namun, penurunan aktivitas pembelahan sel pada kalus hasil elisitasi dengan ion logam yang diikuti dengan penurunan kandungan vetiver oil kemungkinan dipengaruhi oleh efektivitas tiap-tiap elisitor ion logam. Menurut Pandiangan (2011), jenis elisitor berpengaruh terhadap kandungan metabolit sekunder yang dihasilkan. Selain jenis elisitor, kandungan metabolit sekunder juga dipengaruhi oleh konsentrasi elisitor yang ditambahkan pada medium kultur. Tiap-tiap elisitor memiliki kemampuan meningkatkan kandungan metabolit sekunder pada konsentrasi tertentu. Konsentrasi optimum yang dapat memacu peningkatan kandungan metabolit sekunder bersifat spesifik pada masing-masing komponen.





## BAB V PENUTUP

### 5.1. Kesimpulan

Pertumbuhan kalus pada tanaman akar wangi dipengaruhi oleh jenis eksplan dan elisitor. Eksplan tiler dapat menginduksi kalus lebih cepat dan menghasilkan pertumbuhan kalus yang lebih baik dibandingkan eksplan *crown*. Penambahan elisitor ion logam atau karbohidrat dalam medium kultur menghambat pertumbuhan kalus dan berpengaruh terhadap komponen kimia *vetiver oil*. Kalus hasil elisitasi dengan ion logam maupun karbohidrat menghasilkan beberapa senyawa bioaktif, antara lain *vetiverol*, *alpha sinensal*, *alpha amorphene*, *vanilin*, *hexadecane*, *octadecane*, dan *eicosane*. Di antara beberapa senyawa bioaktif yang dihasilkan tersebut, terdapat 3 komponen utama penyusun *vetiver oil*, yaitu *vetiverol*, *alpha sinensal* dan *alpha amorphene*. *Vetiverol* dapat terkeskpresi pada kalus kontrol dan kalus akar wangi yang dielisitasi dengan ion logam Pb atau Al dengan konsentrasi *vetiverol* terbesar terdapat pada kalus hasil elisitasi dengan ion logam Pb. Komponen *alpha sinensal* dan *alpha amorphene* dihasilkan pada kalus hasil elisitasi dengan ion logam Cd. Pertumbuhan kalus akar wangi hasil elisitasi tidak berkorelasi dengan jumlah dan kandungan *vetiver oil*.

### 5.2. Saran

Pada penelitian ini penambahan elisitor ion logam Cd dengan konsentrasi 0,1 mM pada medium kultur mampu memacu munculnya komponen utama *vetiver oil* berupa *alpha sinensal* dan *alpha amorphene*. Selain itu, elisitor ion logam Pb pada konsentrasi 0,1 mM dan pektin pada konenstrasi 100 ppm masing-masing dapat meningkatkan kandungan *vetiverol* dan *vanilin*. Berdasarkan hal tersebut, maka perlu dilakukan penelitian lanjutan mengenai konsentrasi Cd, Pb, dan pektin optimum yang dapat menghasilkan kandungan *vetiver oil* tinggi sehingga diperoleh *vetiver oil* (minyak akar wangi) dengan kualitas tinggi.



## DAFTAR PUSTAKA

- Abd Elaleem, K. G., Magda M.A. & Moawiya K.M.N. 2015. Effect of Explants and Plant Growth Regulators on Callus Induction in *Ricinus communis* L. *Res. J. Pharmaceutical Sci.* 4(1), 1-6.
- Abraham, 2011. Telaah Komponen-komponen Minyak Akar Wangi Tumbuhan *Vetiveria zizanioides* Liar Asal Bone secara Kromatografi Gas-Spektrofotometri Massa. *Paradigma*, 15 (2):125-132.
- Adams, R. P., Mitiku H., Sunghun P., & R. Dafforn. 2004. Preliminary Comparison of Vetiver Root Essential Oils from Cleansed (Bacteria- and Fungus-Free) Versus Non-Cleansed (Normal) Vetiver Plants. *Biochemical Systematics and Ecology*, 32 : 1137–1144.
- Agusta, A. 2000. **Minyak Atsiri Tumbuhan Tropika Indonesia**. Penerbit ITB. Bandung.
- Akande, S.R., Morufat O. B. & Benjamin A. O. 2009. Effects of Plant Growth Regulators and Explant Types on Callus Formation in African Yam Bean (*Sphenostylis stenocarpa* (Hochst. Ex A. Rich) Harms). *Kasetsart J. Nat. Sci.* 43(3) : 442 – 448.
- Akula, R. & Gokare A.R. 2011. Influence of Biotic Stress Signals on Secondary Metabolites in Plants. *Plant Signaling & Behavior*, 6: 1720-1731.
- Amali, P., Kingsley, S. J., & Ignacimuthu, S. 2014. High Frequency Callus Induction and Plant Regeneration from Shoot Tip Explants of *Sorghum Bicolor* L. Moench. *Int J Pharm Pharm Sci.* 6(6): 213-216.
- Angelova, Z. ,S. Georgiev, & W. Roos. 2006. Elicitation of Plants. *Biotechnol. & Biotechnol. Eq*: 72-83.
- Arivalagan, U., Peter G.A. & Arun N. 2012. Effect of Growth Hormones on Callus Induction of *Sauropus androgynous* (Sweet Shoot). *Annals of Biological Research*, 3 (10):4668-4674.
- Bappebti. 2012. **Java Vetiver Root Oil (Akar Wangi)**. Redaksi Buletin Kontrak Berjangka.
- Baque, Md. A., Md. Humayun K.S., Eun-Jung L., & Kee-Yoeup P. 2012. Elicitor Effect of Chitosan and Pectin on the Biosynthesis of Anthraquinones, Phenolics and Flavonoids in Adventitious Root Suspension Cultures of *Morinda citrifolia* (L.). *AJCS*, 6(9):1349-1355.
- Bhojwani S.S. & Razdan M.K. 1996. **Plant Tissue Culture**. Elsevier. New York.

- Cedo, M. L. O, Ma. Joahna N. L., Rocelie R. Z & Constancio C. de Guzman. 2012. Enhanced Plantlet Regeneration and *In Vitro* Root Production in Vetiver [*Vetiveria zizanioides* (L.) Nash]. *Philipp Agric Scientist*. 9(4): 344-351.
- Cetin, E. S., Zehra B., Filiz H.T & Nilgun G.B. 2014. The Effects of Cadmium Chloride on Secondary Metabolite Production in *Vitis vinifera* cv. Cell suspension cultures. *Biological Research*, 47:1-6.
- Chahal, K. K., Urvashi B., Sonia K., & Amanpal K. S. 2015. Chemical Composition and Biological Properties of *Chrysopogon zizanioides* (L.) Roberty syn. *Vetiveria zizanioides* (L.) Nash- A Review. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 6 (4): 251-260.
- Champagnat, P., Annie H., André C., Didiet F., André P.C., Jean L.L., 2008. *Flavonoids from Vetiveria zizanioides and Vetiveria nigritana (Poaceae)*. **Biochemical Systematics and Ecology**, 36: 68-70.
- Chaudhry, H., Nida F., dan Iffat Z. A. 2015. Evaluation of Antioxidant and Antibacterial Potentials of *Nigella sativa* L. Suspension Cultures under Elicitation. *BioMed Research International*: 1-13.
- Damanik, Sabarman, 2006. Pengembangan Usaha Pertanian Konservasi Tanaman Akar Wangi. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Danha, L.T., Mamucari ., Truog, P., Foester,N., 2009. Response surface method applied to supercritical carbon dioxide extraction of *Vetiveria zizanioides* essential oil. *Engineering Journal*, 155: 617-626.
- Durrani, N. S., D. Ahmad, A. Jalal, H. Rajab & M. S. Khan. 2017. The Effect of Explant Sources and Growth Regulators on Callus Induction and Regeneration in Different Tomato Cultivars. *The J. Anim. Plant Sci*. 27(2): 481-489.
- ElNour, M.E.M., Ammar M.A.A., & Badr E.A.T.S. 2015. Effect of Different Concentrations of Auxins and Combination with Kinetin on Callus Initiation of *Trigonella Foenum- Graecum*. L. *International Journal of Technical Research and Applications*. 3(2):117-122.
- Estrada, K. R., Heriberto V. L., Diego H., Elisabeth M., Marta G., Rosa M. C., & Javier P. 2016. Elicitation, an Effective Strategy for the Biotechnological Production of Bioactive High-Added Value Compounds in Plant Cell Factories. *Molecules*, 21(182):1-24.

- Esyanti, R. R., Iriawati & Olga M. 2013. Vetiver Oil Production from Root Culture of *Vetiveria zizanioides*. *International Scholarly and Scientific Research & Innovation*, 7(9): 863-866.
- Farag, S. & Oliver K. 2015. Cannabinoids Production by Hairy Root Cultures of *Cannabis sativa* L. *American Journal of Plant Sciences*, 6: 1874-1884.
- Fazal, H., Bilal H. A. & Nisar A. 2014. Optimization of Adventitious Root Culture for Production of Biomass and Secondary Metabolites in *Prunella vulgaris* L. *Appl Biochem Biotechnol*: 1-10.
- Filizadeh Y. & Goodarzi G. 2010. Essential Oils from Hairy Root Cultures and Field Cultivated Roots of Valerian (*Valeriana sisymbriifolium*). *Journal of Medicinal Plants*, 9 (35): 120-128.
- Gandi, S., Kiranmayee R., Bhuvanewari C., & Archana G. 2012. Elicitation of Andrographolide in the Suspension Cultures of *Andrographis paniculata*. *Appl Biochem Biotechnol*, 168:1729–1738.
- Ghosh, S., Biswajit G., & Sumita J. 2006. Aluminium Chloride Enhances Colchicine Production in Root Cultures of *Gloriosa superba*. *Biotechnology Letters*, 28: 497-503.
- George, E. F. 1993. **Plant Propagation by Tissue Culture**. Eastern Press. Eversely, 575p.
- Ghosh, S., Biswajit G., & Sumita J. 2006. Aluminium Chloride Enhances Colchicine Production in Root Cultures of *Gloriosa superba*. *Biotechnology Letters*, 28: 497-503.
- Grech-Baran, M. & Agnieszka P. 2012. *Artemisia* Species *In Vitro* Culture for Production of Biologically Active Secondary Metabolites. *Journal of BioTechnologia*, 93 (4): 371-380.
- Guether, E. 2000. **Minyak Atsiri jilid IVA**. IPB Press. Bogor.
- Hadipoentyanti, E., Susi Purwiyanti, dan Ermia. 2008. Karakterisasi dan Evaluasi Plasma Nutfah Tanaman Akarwangi (*Vetiveria zizanioides*, L.). Prosiding Konferensi Nasional Minyak Atsiri Surabaya 2-4 Desember 2008.
- Harborne, J. B. 1987. **Metode Fitokimia**. Jilid II. Penerbit ITB : Bandung.
- Hartman, H.T. D.E. Kester, & F.T. Daviz-Jr. 1990. **Plant Propagation: Principles and Practices**. Englewood Clifts. Prentice-Hall International, Inc. New Jersey.
- Hendayana, S. 2010. **Kimia Pemisahan Metode Kromatografi dan Elektroforesis Modern**. Remaja Rosdakarya. Bandung.

Henderson, G., Mao, L., Vaughn, J.A., 2006. *Vetiver Oil And Nootkatone Effects on the Growth of Pea and Citrus*. **Industrial Crops and Products**, 23:327–332.

Ibrahim, M.M., Nermeen M.A., Mohamed, A.M. 2015. Effect of Some Elicitors on Chemicals Composition for *Nigella sativa* Callus Cultures. *World J Pharm Sci*, 3(10): 2160-2166.

Indrawanto, C. 2009, Kajian Pengembangan Industri Akar Wangi (*Vetiveria Zizanioides* L.) Menggunakan *Interpretative Structural Modelling*. *Informatika Pertanian* 18 (1): 1-18.

Inggrid, M., Ingrid L., dan Harjoto D. 2010. **Perolehan dan Karakteristik Minyak Akar Wangi (*Vetiveria zizanioides*) Hasil Hidrodistilasi**. Seminar Rekayasa Kimia dan Proses. Jurusan Teknik Kimia Fakultas Teknik. Universitas Diponegoro Semarang.

Irawan, B. 2010. Peningkatan Mutu Minyak Nilam dengan Ekstraksi dan Distilasi pada Berbagai Komposisi Pelarut. **Tesis**. Teknik Kimia Universitas Diponegoro. Semarang.

Iriti, M. & Franco F. 2009. Chemical Diversity and Defence Metabolism: How Plants Cope with Pathogens and Ozone Pollution. *Int. J. Mol. Sci.* 10: 3371-3399.

Kadarohman, A., Ratnaningsih E. S., Gebi D., Lela L. K., Ede K., & Ahmad N. F. 2014. Quality and Chemical Composition of Organic and Non-Organic Vetiver Oil. *Indo. J. Chem* 14 (1): 43 – 50.

Khalili, M., Tahereh H., Seyyed K.K.T. 2010. Ag<sup>+</sup> Enhanced Silymarin Production in Hairy Root Cultures of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. *POJ* 3(4):109-114.

Kristina, N. N, Noveriza, R., Syahid, S. F., & Rizal, M., 2010, Peluang Peningkatan Kadar Kurkumin Pada Tanaman Kunyit dan Temulawak, *Laporan Penelitian*, Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik.

Kumar, S., K. Jyotirmayee, & Monalisa Sarangi. 2013. Thin Layer Chromatography: A Tool of Biotechnology for Isolation of Bioactive Compounds from Medicinal Plants. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, 18(1): 126-132.

Kumari, S., R. K. Pandey, & Uttam K. 2015. *In-vitro* Callus Induction from Two Different Explants Stem and Leaf in *Carthamus-tinctorius* Linn. *Euro. J. Exp. Bio.*, 5(2):1-4.

Massardos, C., Annie H., Andre'e C., Didiet F., Andre P. C., Jean L., 2008. *Flavonoids from Vetiveria zizanioides and Vetiveria nigritana (Poaceae)*, **Biochemical Systematics and Ecology**, 36, 68-70.

- Mendhulkar, V.D. & M.M.A. Vakil. 2013. Chitosan and *Aspergillus niger* Mediated Elicitation of Total Flavonoid in Suspension Culture of *Andrographis paniculata* (Bum. T.) Nees. *Int J Pharm Bio Sci*, 4(4):731-740.
- Moelyono & Muchtaridi. 2015. **Aroma Terapi Tinjauan Aspek Kimia Medisinal**. Graha Ilmu. Yogyakarta.
- Monica, J., Rajput R., & Mishra A. 2013. Enhancement of Secondary Metabolite Biosynthesis in *Bacopa monnieri*: An *In Vitro* Study. *Research Journal of Recent Sciences*, 2(1): 13-16.
- Mucciarelli, M., Marisa G., Silvano S. & Massimo M. 1993. Callus induction and Plant Regeneration in *Vetiveria zizanioides*. *Kluwer Academic Publishers*. 35: 267-271.
- Mulyati H, Setiawan A, Rusli M. 2009. Rancang Bangun Sistem Manajemen Rantai Pasokan dan Risiko Minyak Akar Wangi Berbasis IKM di Indonesia. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Mulyono, 2012. Peningkatan Mutu dan Efisiensi Produksi Minyak Akar Wangi Melalui Teknologi Penyulingan dengan Tekanan Uap Bertahap. *Buletin Teknologi Pascananen Pertanian* 8 (1): 35-47.
- Munawaroh, S. & Prima A. H. 2010. Ekstraksi Minyak Daun Jeruk Purut (*Citrus hystrix* D.C.) dengan Pelarut Etanol dan n-Heksana. *Jurnal Kompetensi*, 2(1):73-78.
- Ningsih, I. Y. 2014. Pengaruh Elisitor Biotik dan Abiotik pada Produksi Flavonoid melalui Kultur Jaringan Tanaman. *Pharmacy*, 11 (2): 117-130.
- Paz, T. A., Vânia A. F. F. M. dos Santos, Marielle C. I., Edieidia S. P., Ana M. S. P., & Maysa F. 2013. Production of the Quinone-Methide Triterpene Maytenin by *In Vitro* Adventitious Roots of *Peritassa campestris* (Cambess.) A.C.Sm. (Celastraceae) and Rapid Detection and Identification by APCI-IT-MS/MS. *BioMed Research International*: 1-7.
- Pierik, R.L.M. 1997. ***In Vitro Culture of Higher Plants***. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht. The Netherlands.
- Raghavendra, S., Chapeyl K.R., Vadlapudi K., & Mahaboob H.M.K. 2012. Elicitors and Precursor Induced Effect on L-Dopa Production in Suspension Cultures of *Mucuna pruriens* L. *Frontiers in Life Science*, 5 (3-4): 127-133.
- Raharjo, T. J. 2013. **Kimia Hasil Alam**. Pustaka Pelajar. Yogyakarta.
- Rahmawati, N., Yulfi Z., dan R. Y. Perry B. 2010. Pemanfaatan Minyak Atsiri Akar Wangi (*Vetiveria Zizanioides*) Dari Famili Poaceae Sebagai Senyawa Antimikroba Dan Insektisida Alami.

- Rizzello, F. Angelo D. P., Miriana D., Federica B., Giovanni M., & Sofia C. 2014. Enhanced Production of Bioactive Isoprenoid Compounds from Cell Suspension Cultures of *Artemisia annua* L. Using  $\beta$ -Cyclodextrins. *Int. J. Mol. Sci.* 15: 19092-19195.
- Robi'ah, A. 2013. Kinetika Pertumbuhan dan Kandungan Saponin Akar Adventif Ginseng Jawa (*Talinum paniculatum* Gaertn.) pada Berbagai Konsentrasi Sukrosa dan Variasi Konsentrasi Medium MS dalam Kultur Cair. Departemen Biologi, Fakultas Sains dan teknologi, Universitas Airlangga, Surabaya. Tesis.
- Rusli, M. S., Erliza N., Risfaheri, Edi M., Tuti T., dan Rosniyati S. 2009. Optimasi Kinerja Proses Distilasi Minyak Akar Wangi Dengan Modifikasi Suhu Dan Kesetimbangan Fasa. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia* 14 (1): 65-72.
- Sabini, D. 2006. Aplikasi Minyak Atsiri pada Produk *Home Care* dan *Personal Care*. Prosiding Konferensi Nasional Minyak Atsiri 2006. Departemen Perindustrian: 11-19.
- Salisbury, F. B. & Cleon W. R. 1995. **Fisiologi Tumbuhan**. ITB. Bandung.
- Sani, 2011. **Minyak Dari Tumbuhan Akar Wangi**. Unesa University Press. Surabaya.
- Sani, Z. S., Rofiah R. dan Mahfud. 2012. Pengambilan Minyak Atsiri dari Melati dengan Metode Enfleurasi dan Ekstraksi Pelarut Menguap. *Jurnal Teknik Pomits*, 1 (1): 1-4.
- Santoso, H. B. 1993. "*Akar Wangi. Kanisius*". Yogyakarta.
- Saraswathi, K. J. T., N. R. Jayalakshmi, P. Vyshali & M. N. S. Kameshwari. 2011. Comparative Study on Essential Oil in Natural and In Vitro Regenerated Plants of *Vetiveria zizanioides* (Linn.) Nash. *J. Agric. & Environ. Sci.*, 10 (3): 458-461.
- Sastrohamidjojo, H. 2007. **Dasar-Dasar Spektrofotokopi**, edisi kedua, cetakan kedua. Penerbit Liberty. Jogjakarta.
- Satdive, R. K. , Suchita K., Shradha S., Sudhir S. & Devanand P. F. 2014. The Influence of Cadmium as Abiotic Elicitor on the Production of Phytoestrogens in Hairy Root Cultures of *Psoralea Corylifolia*. *Int J Pharm Bio Sci*, 5(2): 548 – 558.
- Savita, Vijay, G.S. Virk & Avinash N.I. 2010. Effect of Explant Type and Different Plant Growth Regulators on Callus Induction and Plantlet Regeneration in *Citrus jambhiri* Lush. *Environ. We Int. J. Sci. Tech.* 5: 97-106.
- Sell, C. S., 2003. *A Fragrant Introduction to Terpenoid Chemistry*; The Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, Cambridge, UK.

- Shao, L., Mei H. B., Dong S. O., Chong Z. W., Chun S. Y., Hong H. Z., & Wei H. H. 2014. Unstable Simple Volatiles and Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Analysis of Essential Oil from the Roots Bark of *Oplopanax Horridus* Extracted by Supercritical Fluid Extraction. *Molecules*, 19: 19708-19717.
- Soares, H. C. P., Paloma R. M., Juceni P. D., Paulo R. R. M. Ademir E. do V., Frederico de M. R., Pedro A. de P. P., Jose R. F. de S., Fabio S. de O., Jailson B. de A., & Jorge M. D. 2013. Volatile Organic Compounds Obtained by *In Vitro* Callus Cultivation of *Plectranthus ornatus* Codd. (Lamiaceae). *Molecules*, 18:10320-10333.
- Sompornpailin, K. & Chonnikarn K. 2016. Synergistic Effects of BAP and Kinetin Media Additives on Regeneration of Vetiver Grass (*Vetiveria zizanioides* L. Nash). *AJCS*. 10(5): 726-731.
- Spollansky, T.C., Sandra I. P. A., S., & Ana M.G. 2000. Effect of Jasmonic Acid and Aluminum on Production of Tropane Alkaloids in Hairy Root Cultures of *Brugmansia candida*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 3(1):72-75.
- Sumaryono, Imron R., Tri P., Salwa L. D., & Diah R. 2009. Produksi Kuinolin secara Cepat dari Kultur Jaringan Tanaman Kina, *Laporan Penelitian*, Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia.
- Taiz, L. & Zeiger, E. 1991. **Plant Physiology**. The Benjamin/Cummings Publishing. Redwood City.
- Taiz, L. & Zeiger, E. 2002. **Plant Physiology**. Sinauer Associates, Inc. U.S.A.
- Umami, N., Ryo A., Takahiro G., Genki I. & Hidenori T. 2016. Study on Callus Induction System of 4 Genotype of Napiergrass (*Pennisetum purpureum* ). *Animal Production*. 18(3): 131-140.
- Wardani, D.P., Solichatun, & Ahmad Dwi S. 2004. Pertumbuhan dan Produksi Saponin Kultur Kalus *Talinum paniculatum* Gaertn. pada Variasi Penambahan Asam 2,4-Diklorofenoksi Asetat (2,4-D) dan Kinetin. *Biofarmasi*. 2(1): 35-43.
- Wawrosch, C., Stefan S., Hermann S., & Brigitte K. 2014. Lignan formation in hairy root cultures of Edelweiss (*Leontopodium nivale* ssp. *alpinum* (Cass.) Greuter). *Fitoterapia*, 97: 219–223.
- Wetter, L.R. & F. Constabel. 1991. **Metode Kultur Jaringan Tanaman**. ITB. Bandung.

Yonghong Li, Junping G. & Shui-zhang F. 2009. High Frequency *In Vitro* Embryogenic Callus Induction and Plant Regeneration From Indiagrass Mature Caryopsis. *Scientia Horticulturae*. 119: 306–309.

Yuliana, A. 2003. Pengaruh Penambahan Polisakarida Sebagai Elisitor Untuk Produksi Antioksidan Selama Germinasi Biji Kacang Tunggak (*Vigna Unguiculata*) dan Kedelai Hitam (*Glycine Max*). Skripsi. Fakultas Teknologi Pertanian. IPB. Bogor.

Zhang, Z., Zhenyan Y. , Zhaoxia J., Jun L., & Yunfang L. 2013. Liquid Culture of Adventitious Roots is a Potential Alternative to Field Cultivation for *Psammosilene tunicoides*, a Rare and Endangered Endemic Medicinal Plant. *Advance Journal of Food Science and Technology* 5(2): 127-131.

Zulkarnain. 2011. Kultur Jaringan Tanaman. Bumi Aksara. Jakarta.

Zulmunir, S. 2010. <https://m.tempo.co/read/news/2010/12/16/090299338/permintaan-minyak-akar-wangi-meningkat-pengusaha-kewalahan>. Diakses pada tanggal 22 Desember 2016.



LAMPIRAN

Lampiran 1. Analisis Statistik

1.1 Induksi Kalus

Uji beda nilai rata-rata

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Berat\_basah\_kalus

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.385 <sup>a</sup>	9	.043	10.117	.000
Intercept	1.981	1	1.981	469.172	.000
Jenis_eksplan	.271	1	.271	64.108	.000
Konsentrasi_kinetin	.088	4	.022	5.232	.005
Jenis_eksplan * Konsentrasi_kinetin	.025	4	.006	1.506	.238
Error	.084	20	.004		
Total	2.450	30			
Corrected Total	.469	29			

a. R Squared = .820 (Adjusted R Squared = .739)

1.1.1 Jenis Eksplan

a. Uji homogenitas data

Test of Homogeneity of Variances

Berat\_basah\_kalus

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.092	1	28	.764

b. Uji beda nyata

ANOVA

Berat\_basah\_kalus

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.271	1	.271	38.234	.000
Within Groups	.198	28	.007		
Total	.469	29			

### 1.1.2 Konsentrasi Kinetin

#### a. Uji homogenitas data

##### Test of Homogeneity of Variances

Berat\_basah\_kalus

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.306	4	25	.086

#### b. Uji beda nyata

##### ANOVA

Berat\_basah\_kalus

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.088	4	.022	1.451	.247
Within Groups	.381	25	.015		
Total	.469	29			

## 2.1 Elisitasi

### 2.2.1 Elisitor ion logam

#### a. Uji normalitas data

##### One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Jenis_elisitor	Berat_basah_kalus	Berat_kering_kalus
N		40	40	40
Normal Parameters <sup>a</sup>	Mean	2.50	.9805	.9275
	Std. Deviation	1.132	.31142	.29715
Most Extreme Differences	Absolute	.171	.094	.104
	Positive	.171	.090	.104
	Negative	-.171	-.094	-.070
Kolmogorov-Smirnov Z		1.079	.598	.656
Asymp. Sig. (2-tailed)		.195	.868	.783

#### a. Test distribution is Normal.

b. Uji homogenitas data

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Berat_basah_kalus	11.567	3	36	.000
Berat_kering_kalus	7.570	3	36	.000

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Berat_basah_kalus Kontrol	10	1.3080	.19865	.06282	1.1659	1.4501	1.06	1.61
Pb	10	1.1020	.28553	.09029	.8977	1.3063	.63	1.49
Al	10	.8890	.08762	.02771	.8263	.9517	.79	1.05
Cd	10	.6230	.06865	.02171	.5739	.6721	.54	.74
Total	40	.9805	.31142	.04924	.8809	1.0801	.54	1.61
Berat_kering_kalus Kontrol	10	1.2060	.23229	.07346	1.0398	1.3722	.84	1.55
Pb	10	1.0630	.28158	.08904	.8616	1.2644	.57	1.45
Al	10	.8440	.08758	.02770	.7813	.9067	.74	1.02
Cd	10	.5970	.07747	.02450	.5416	.6524	.49	.72
Total	40	.9275	.29715	.04698	.8325	1.0225	.49	1.55

c. Uji beda nyata

Robust Tests of Equality of Means

		Statistic <sup>a</sup>	df1	df2	Sig.
Berat_basah_kalus	Brown-Forsythe	25.811	3	19.325	.000
Berat_kering_kalus	Brown-Forsythe	19.251	3	20.905	.000

a. Asymptotically F distributed.

d. Uji lanjutan

Multiple Comparisons

Dependent Variable	(I)	(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		
						Lower Bound	Upper Bound	
						Interval		
Berat_basah_kalus	Games -Howell	Kontrol	Pb	.20600	.11000	.278	-.1086	.5206
			Al	.41900*	.06866	.000	.2161	.6219
			Cd	.68500*	.06646	.000	.4853	.8847
		Pb	Kontrol	-.20600	.11000	.278	-.5206	.1086
			Al	.21300	.09445	.170	-.0726	.4986
			Cd	.47900*	.09287	.002	.1951	.7629
		Al	Kontrol	-.41900*	.06866	.000	-.6219	-.2161
			Pb	-.21300	.09445	.170	-.4986	.0726
			Cd	.26600*	.03520	.000	.1660	.3660
		Cd	Kontrol	-.68500*	.06646	.000	-.8847	-.4853
			Pb	-.47900*	.09287	.002	-.7629	-.1951
			Al	-.26600*	.03520	.000	-.3660	-.1660
Berat_kering_kalus	Games -Howell	Kontrol	Pb	.14300	.11543	.612	-.1844	.4704
			Al	.36200*	.07851	.003	.1274	.5966
			Cd	.60900*	.07743	.000	.3759	.8421
		Pb	Kontrol	-.14300	.11543	.612	-.4704	.1844
			Al	.21900	.09325	.147	-.0628	.5008
			Cd	.46600*	.09235	.002	.1852	.7468
		Al	Kontrol	-.36200*	.07851	.003	-.5966	-.1274
			Pb	-.21900	.09325	.147	-.5008	.0628
			Cd	.24700*	.03698	.000	.1423	.3517
		Cd	Kontrol	-.60900*	.07743	.000	-.8421	-.3759
			Pb	-.46600*	.09235	.002	-.7468	-.1852
			Al	-.24700*	.03698	.000	-.3517	-.1423

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

## 2.2.2 Elisitor karbohidrat

### a. Uji normalitas data

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Jenis_elisitor	Berat_basah_kalus	Berat_kering_kalus
N		40	40	40
Normal Parameters <sup>a</sup>	Mean	2.50	.9458	.8623
	Std. Deviation	1.132	.29839	.31171
Most Extreme Differences	Absolute	.171	.090	.071
	Positive	.171	.090	.071
	Negative	-.171	-.072	-.063
Kolmogorov-Smirnov Z		1.079	.570	.448
Asymp. Sig. (2-tailed)		.195	.901	.988

a. Test distribution is Normal.

### b. Uji homogenitas data

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Berat_basah_kalus	2.579	3	36	.069
Berat_kering_kalus	1.014	3	36	.398

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Berat_basah Kontrol	10	1.3080	.19865	.06282	1.1659	1.4501	1.06	1.61
_kalus Arabic Gum	10	1.0280	.15725	.04973	.9155	1.1405	.80	1.23
Kitosan	10	.8230	.15945	.05042	.7089	.9371	.61	1.05
Pektin	10	.6240	.10543	.03334	.5486	.6994	.51	.79
Total	40	.9458	.29839	.04718	.8503	1.0412	.51	1.61
Berat_kering Kontrol	10	1.2060	.23229	.07346	1.0398	1.3722	.84	1.55
_kalus Arabic Gum	10	.9690	.17117	.05413	.8466	1.0914	.73	1.19
Kitosan	10	.7560	.17456	.05520	.6311	.8809	.45	1.02
Pektin	10	.5180	.13831	.04374	.4191	.6169	.33	.76
Total	40	.8623	.31171	.04929	.7626	.9619	.33	1.55

c. Uji beda nyata

**ANOVA**

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Berat_basah_kalus	Between Groups	2.566	3	.855	33.963	.000
	Within Groups	.907	36	.025		
	Total	3.472	39			
Berat_kering_kalus	Between Groups	2.594	3	.865	26.028	.000
	Within Groups	1.196	36	.033		
	Total	3.789	39			

d. Uji lanjutan

**Berat\_basah\_kalus**

Duncan

Jenis_elisitor	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Pektin	10	.6240			
Kitosan	10		.8230		
Arabic Gum	10			1.0280	
Kontrol	10				1.3080
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

**Berat\_kering\_kalus**

Duncan

Jenis_elisitor	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Pektin	10	.5180			
Kitosan	10		.7560		
Arabic Gum	10			.9690	
Kontrol	10				1.2060
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

### 1.3 Korelasi Berat Kering Kalus dengan Jumlah Komponen Vetiver Oil

#### 1.3.1 Ion Logam

a. Uji normalitas data

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Berat_kering_kalus	Jumlah_kompoen_vetiver_oil
N		4	4
Normal Parameters <sup>a</sup>	Mean	.9275	2.00
	Std. Deviation	.26600	.816
Most Extreme Differences	Absolute	.191	.250
	Positive	.144	.250
	Negative	-.191	-.250
Kolmogorov-Smirnov Z		.382	.500
Asymp. Sig. (2-tailed)		.999	.964

a. Test distribution is Normal.

b. Uji korelasi

Correlations

		Berat_kering_kalus	Jumlah_kompoen_vetiver_oil
Berat_kering_kalus	Pearson Correlation	1	-.706
	Sig. (2-tailed)		.294
	N	4	4
Jumlah_kompoen_vetiver_oil	Pearson Correlation	-.706	1
	Sig. (2-tailed)	.294	
	N	4	4

### 1.3.2 Karbohidrat

#### a. Uji normalitas data

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Berat_kering_kalus	Jumlah_komponen_vetiver_oil
N		4	4
Normal Parameters <sup>a</sup>	Mean	.8625	1.00
	Std. Deviation	.29568	.816
Most Extreme Differences	Absolute	.148	.250
	Positive	.148	.250
	Negative	-.142	-.250
Kolmogorov-Smirnov Z		.296	.500
Asymp. Sig. (2-tailed)		1.000	.964

a. Test distribution is Normal.

#### b. Uji korelasi

Correlations

		Berat_kering_kalus	Jumlah_komponen_vetiver_oil
Berat_kering_kalus	Pearson Correlation	1	.331
	Sig. (2-tailed)		.669
	N	4	4
Jumlah_komponen_vetiver_oil	Pearson Correlation	.331	1
	Sig. (2-tailed)	.669	
	N	4	4

## 1.4 Korelasi Berat Kering Kalus dengan Kelimpahan Komponen Vetiver Oil

### 1.4.1 Ion Logam

a. Uji normalitas data

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Berat_kering_	Kandungan_	Kandungan_	Kandungan_	Kandungan_
		_kalus	vetiverol	vanilin	alpha_sinensal	alpha_amorphene
N		4	4	4	4	4
Normal	Mean	.9275	2.9850	.4605	.0435	.1265
	Std. Deviation	.26600	2.01506	.46998	.08700	.25300
Most Extreme Differences	Absolute	.191	.368	.192	.441	.441
	Positive	.144	.247	.192	.441	.441
	Negative	-.191	-.368	-.164	-.309	-.309
Kolmogorov-Smirnov Z		.382	.736	.384	.883	.883
Asymp. Sig. (2-tailed)		.999	.651	.999	.417	.417

a. Test distribution is Normal.

b. Uji korelasi

Correlations

		Berat_kering_	Kandungan_	Kandungan_	Kandungan_	Kandungan_
		_kalus	vetiverol	vanilin	alpha_sinensal	alpha_amorphene
Berat_kering_ kalus	Pearson Correlation	1	.865	.497	-.821	-.821
	Sig. (2-tailed)		.135	.503	.179	.179
	N	4	4	4	4	4
Kandungan_ vetiverol	Pearson Correlation	.865	1	.259	-.988*	-.988*
	Sig. (2-tailed)	.135		.741	.012	.012
	N	4	4	4	4	4
Kandungan_ vanilin	Pearson Correlation	.497	.259	1	-.334	-.334
	Sig. (2-tailed)	.503	.741		.666	.666
	N	4	4	4	4	4
Kandungan_ alpha_sinensal	Pearson Correlation	-.821	-.988*	-.334	1	1.000**

	Sig. (2-tailed)	.179	.012	.666		.000
	N	4	4	4	4	4
Kandungan_alpha_amorphene	Pearson Correlation	-.821	-.988*	-.334	1.000**	1
	Sig. (2-tailed)	.179	.012	.666	.000	
	N	4	4	4	4	4

\*. Correlation is significant at the 0.05 level

\*\* Correlation is significant at the 0.01 level

## 1.4.2 Karbohidrat

### a. Uji normalitas data

**One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		Berat_kering_kalus	Kandungan_vanilin
N		4	4
Normal Parameters <sup>a</sup>	Mean	.8625	1.5940
	Std. Deviation	.29568	1.18724
Most Extreme Differences	Absolute	.148	.301
	Positive	.148	.196
	Negative	-.142	-.301
Kolmogorov-Smirnov Z		.296	.602
Asymp. Sig. (2-tailed)		1.000	.862

a. Test distribution is Normal.

### b. Uji korelasi

**Correlations**

		Berat_kering_kalus	Kandungan_vanilin
Berat_kering_kalus	Pearson Correlation	1	-.542
	Sig. (2-tailed)		.458
	N	4	4
Kandungan_vanilin	Pearson Correlation	-.542	1
	Sig. (2-tailed)	.458	
	N	4	4

## Lampiran 2. Perhitungan Rendemen Ekstrak

### 2.1 Kalus hasil elisitasi dengan ion logam

#### 2.1.1 Kalus kontrol

$$\text{Berat botol kosong} = 21,82 \text{ g}$$

$$\text{Berat botol kosong} + 2 \text{ ml pelarut pekat} = 23,41 \text{ g}$$

$$\text{Berat ekstrak} = (\text{Berat botol kosong} + 2 \text{ ml pelarut pekat}) - \text{Berat botol kosong}$$

$$= (23,41 - 21,82) \text{ g}$$

$$= 1,59 \text{ g}$$

$$\text{Rendemen ekstrak} = \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat kalus yang diekstrak}} \times 100\%$$

$$= \frac{1,59 \text{ g}}{10 \text{ g}} \times 100\%$$

$$= 15,9 \%$$

#### 2.1.2 Kalus hasil elisitasi dengan ion logam Pb

$$\text{Berat botol kosong} = 14,42 \text{ g}$$

$$\text{Berat botol kosong} + 2 \text{ ml pelarut pekat} = 16,26 \text{ g}$$

$$\text{Berat ekstrak} = (\text{Berat botol kosong} + 2 \text{ ml pelarut pekat}) - \text{Berat botol kosong}$$

$$= (16,26 - 14,42) \text{ g}$$

$$= 1,82 \text{ g}$$

$$\text{Rendemen ekstrak} = \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat kalus yang diekstrak}} \times 100\%$$

$$= \frac{1,82 \text{ g}}{10 \text{ g}} \times 100\%$$

$$= 18,2 \%$$

2.1.3 Kalus hasil elisitasi dengan ion logam Al

Berat botol kosong = 10,95 g

Berat botol kosong + 2 ml pelarut pekat = 12,76 g

Berat ekstrak = (Berat botol kosong + 2 ml pelarut pekat) - Berat botol kosong

= (12,76 - 10,95) g

= 1,81 g

$$\text{Rendemen ekstrak} = \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat kalus yang diekstrak}} \times 100\%$$

$$= \frac{1,81 \text{ g}}{10 \text{ g}} \times 100\%$$

$$= 18,1 \%$$

2.1.4 Kalus hasil elisitasi dengan ion logam Cd

Berat botol kosong = 10,95 g

Berat botol kosong + 2 ml pelarut pekat = 12,53 g

Berat ekstrak = (Berat botol kosong + 2 ml pelarut pekat) - Berat botol kosong

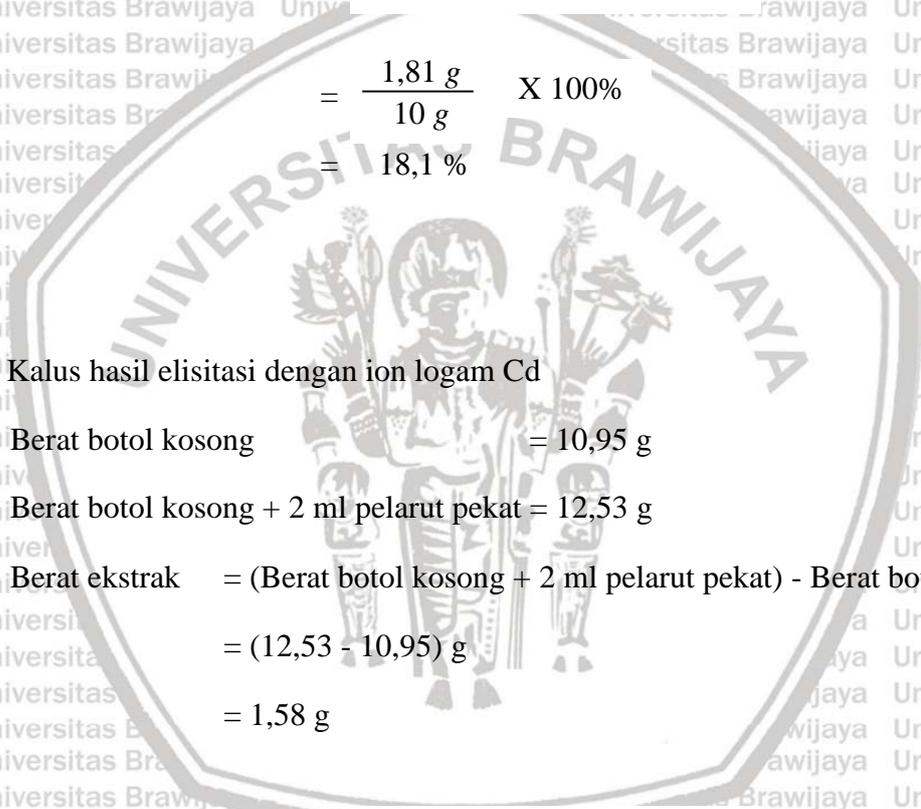
= (12,53 - 10,95) g

= 1,58 g

$$\text{Rendemen ekstrak} = \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat kalus yang diekstrak}} \times 100\%$$

$$= \frac{1,58 \text{ g}}{10 \text{ g}} \times 100\%$$

$$= 15,8 \%$$



## 2.2 Kalus hasil elisitasi dengan karbohidrat

### 2.2.1 Kalus kontrol

$$\text{Berat botol kosong} = 22,50 \text{ g}$$

$$\text{Berat botol kosong} + 2 \text{ ml pelarut pekat} = 24,13 \text{ g}$$

$$\text{Berat ekstrak} = (\text{Berat botol kosong} + 2 \text{ ml pelarut pekat}) - \text{Berat botol kosong}$$

$$= (24,13 - 22,50) \text{ g}$$

$$= 1,63 \text{ g}$$

$$\text{Rendemen ekstrak} = \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat kalus yang diekstrak}} \times 100\%$$

$$= \frac{1,63 \text{ g}}{10 \text{ g}} \times 100\%$$

$$= 16,3 \%$$

### 2.2.2 Kalus hasil elisitasi dengan Arabic gum

$$\text{Berat botol kosong} = 22,47 \text{ g}$$

$$\text{Berat botol kosong} + 2 \text{ ml pelarut pekat} = 24,29 \text{ g}$$

$$\text{Berat ekstrak} = (\text{Berat botol kosong} + 2 \text{ ml pelarut pekat}) - \text{Berat botol kosong}$$

$$= (24,29 - 22,47) \text{ g}$$

$$= 1,82 \text{ g}$$

$$\text{Rendemen ekstrak} = \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat kalus yang diekstrak}} \times 100\%$$

$$= \frac{1,82 \text{ g}}{10 \text{ g}} \times 100\%$$

$$= 18,2 \%$$

### 2.2.3 Kalus hasil elisitasi dengan kitosan

$$\text{Berat botol kosong} = 21,31 \text{ g}$$

$$\text{Berat botol kosong} + 2 \text{ ml pelarut pekat} = 23,12 \text{ g}$$

$$\text{Berat ekstrak} = (\text{Berat botol kosong} + 2 \text{ ml pelarut pekat}) - \text{Berat botol kosong}$$

$$= (23,12 - 21,31) \text{ g}$$

$$= 1,81 \text{ g}$$

$$\text{Rendemen ekstrak} = \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat kalus yang diekstrak}} \times 100\%$$

$$= \frac{1,81 \text{ g}}{10 \text{ g}} \times 100\%$$

$$= 18,1 \%$$

### 2.2.4 Kalus hasil elisitasi dengan pektin

$$\text{Berat botol kosong} = 23,61 \text{ g}$$

$$\text{Berat botol kosong} + 2 \text{ ml pelarut pekat} = 25,21 \text{ g}$$

$$\text{Berat ekstrak} = (\text{Berat botol kosong} + 2 \text{ ml pelarut pekat}) - \text{Berat botol kosong}$$

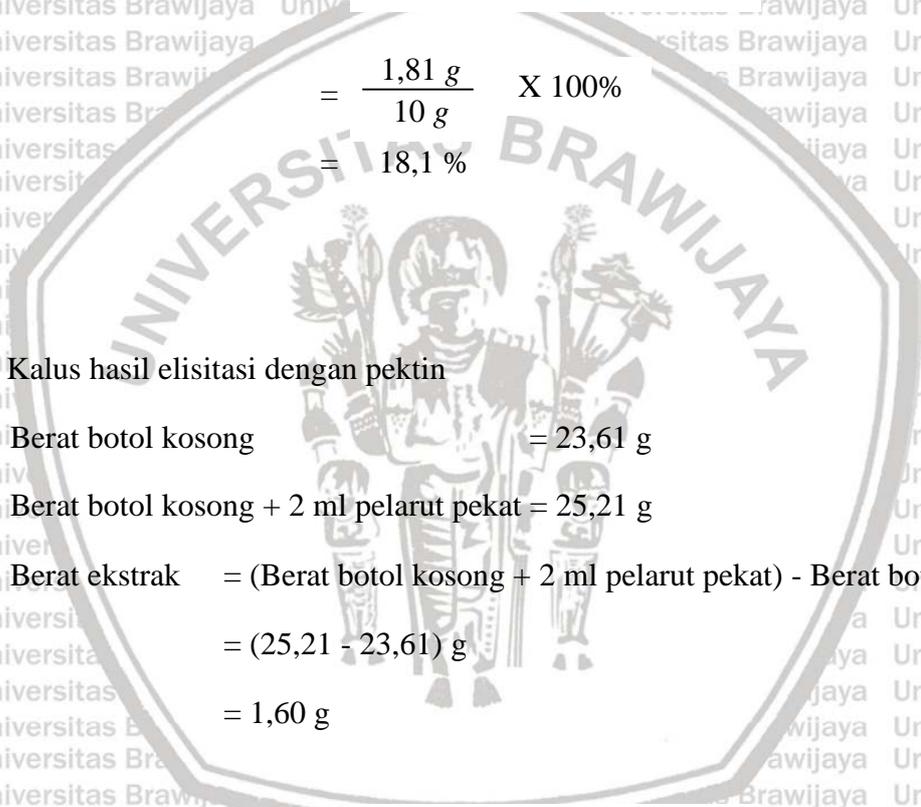
$$= (25,21 - 23,61) \text{ g}$$

$$= 1,60 \text{ g}$$

$$\text{Rendemen ekstrak} = \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat kalus yang diekstrak}} \times 100\%$$

$$= \frac{1,60 \text{ g}}{10 \text{ g}} \times 100\%$$

$$= 16 \%$$



Lampiran 3. Kromatogram GC-MS Kalus Hasil Elisitasi dengan Ion Logam

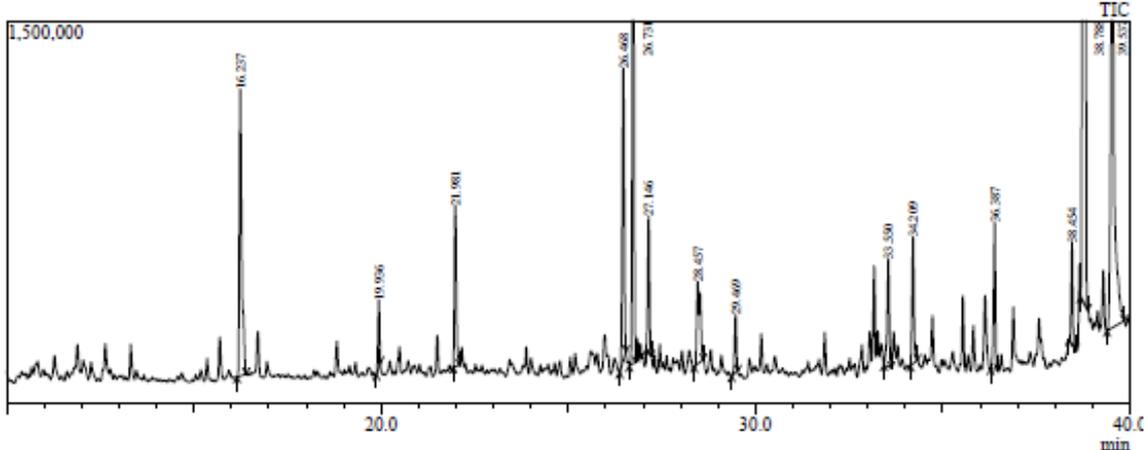
3.1. Kontrol



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI  
 UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
 LABORATORIUM SENTRAL ILMU HAYATI  
 Jl Veteran, Malang 65145, Indonesia  
 Telp/Fax. +62341 559054

http://lsh.ub.ac.id Email : laboratoriumsentral@Ub.ac.id ; laboratoriumsentral@gmail.com

Chromatogram K.D:TUGAS AKHIR S2/Arbaul Fauziah/Logam/K.qgd



Quantitative Result Table

ID#	Name	R.Time	m/z	Area	Height	Conc.	Conc.Unit
1	Hexanal (CAS) n-Hexanal	3.652	43.00	1872089	253771	3.308 %	
2	2-Pentanol (CAS) Pentan-2-ol	3.922	45.00	7779829	984803	13.745 %	
3	Hydroperoxide, 1-ethylbutyl (CAS) 3-Hexyl	7.635	43.00	746248	126480	1.318 %	
4	Hexane, 2,3,5-trimethyl- (CAS) 2,3,5-Trimet	7.920	43.00	547860	91554	0.968 %	
5	Benzothiazole (CAS) Vanguard BT	16.237	135.00	1656073	430038	2.926 %	
6	Hexadecane (CAS) n-Hexadecane	19.936	71.00	204464	68450	0.361 %	
7	Benzaldehyde, 4-hydroxy-3-methoxy- (CAS	21.980	152.00	613902	165798	1.085 %	
8	2,5-Dimethoxyterephthylins-1,4-benzogun	26.468	69.00	1466703	397138	2.591 %	
9	Phenol, 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methyl-	26.727	205.00	2256327	704738	3.986 %	
10	Hexadecane (CAS) n-Hexadecane	27.145	71.00	496138	131360	0.877 %	
11	Dodecanamide, N,N-bis(2-hydroxyethyl)-	28.456	60.00	179908	46822	0.318 %	
12	Propanoic acid, 2-methyl-, 1-(1,1-dimethylet	29.469	71.00	368490	109518	0.651 %	
13	Hexadecane (CAS) n-Hexadecane	33.549	57.00	380943	95906	0.673 %	
14	Tetradecanoic acid (CAS) Myristic acid	34.210	60.00	223898	57793	0.396 %	
15	1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-methylp	36.388	149.00	700733	237267	1.238 %	
16	Hexadecane (CAS) n-Hexadecane	38.453	57.00	374121	113503	0.661 %	
17	1,2-Benzenedicarboxylic acid, dibutyl ester (	38.789	149.00	30305774	6114539	53.544 %	
18	Pentadecanoic acid (CAS) Pentadecylic acid	39.536	73.00	811513	175576	1.434 %	
19	Pentacosane (CAS) n-Pentacosane	41.128	57.00	408362	121541	0.721 %	
20	Hexadecanoic acid, 1-methylethyl ester (CA	41.393	61.00	107252	33000	0.189 %	
21	Docosane (CAS) n-Docosane	43.261	57.00	324656	112425	0.574 %	
22	Hexadecanoic acid, butyl ester (CAS) n-Buty	44.426	56.00	516934	202125	0.913 %	
23	Benzoic acid, hexyl ester (CAS) n-Hexyl bec	45.917	123.00	345575	144592	0.611 %	
24	Phenol, 2,2'-methylenebis[6-(1,1-dimethylet	47.020	177.00	893537	300607	1.579 %	
25	Di-(2-ethylhexyl)phthalate	48.516	149.00	2351196	1054976	4.154 %	
26	1,1-Diphenyl-2-cyano-2-carbo-octoxy-ethyls	49.526	232.00	334032	151723	0.590 %	
27	Lycoparone	51.233	69.00	333251	149921	0.589 %	



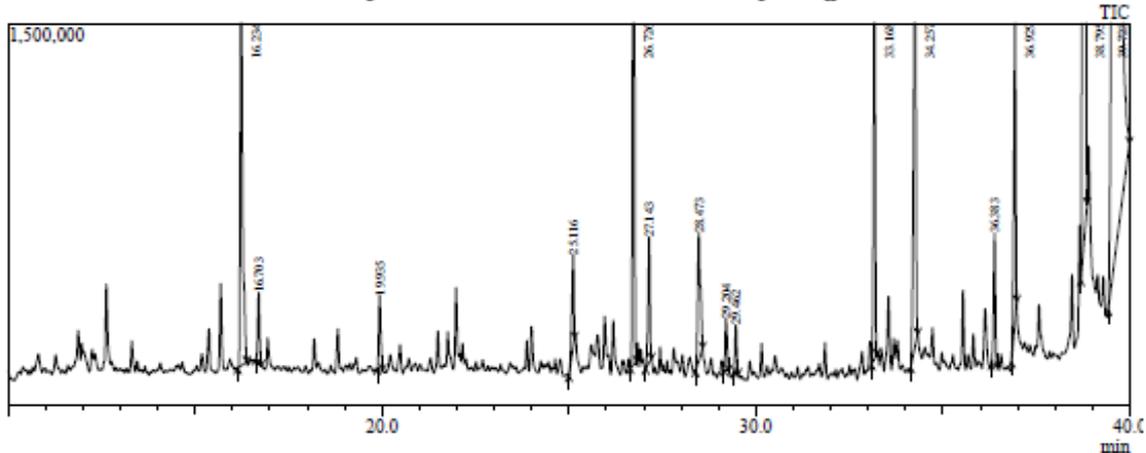
### 3.2 Ion Logam Pb



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
LABORATORIUM SENTRAL ILMU HAYATI  
Jl Veteran, Malang 65145, Indonesia  
Telp/Fax. +62341 559054

http://isih.ub.ac.id Email : laboratoriumsentral@Ub.ac.id ; laboratoriumsentral@gmail.com

Chromatogram Pb D:\TUGAS AKHIR S2\Arbaut Fauziah\Logam\Pb.qgd



Quantitative Result Table

ID#	Name	R. Time	m/z	Area	Height	Conc.	Conc. Unit
1	Hexanal (CAS) n-Hexanal	3.647	43.00	2103763	290348	3.351 %	
2	2-Pentanol (CAS) Pentan-2-ol	3.923	45.00	10985528	1335050	17.482 %	
3	Hydroperoxida, 1-ethylbutyl (CAS) 3-Hexyl	7.625	43.00	620708	110664	0.988 %	
4	Benzothiazole (CAS) Vanguard BT	16.234	135.00	2181177	543295	3.471 %	
5	3-(2'-METHYLPROP-2'-ENYLIDENE)TEI	16.704	80.00	165694	41500	0.264 %	
6	Heptadecane, 2,6,10,15-tetramethyl- (CAS)	19.933	71.00	200756	64207	0.319 %	
7	9-Octadecenoic acid (Z)- (CAS) Oleic acid	25.118	55.00	267113	58631	0.425 %	
8	Phenol, 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methyl-	26.725	205.00	2742729	905031	4.365 %	
9	Hexadecane (CAS) n-Hexadecane	27.144	57.00	539372	126718	0.858 %	
10	Dodecanamide, N,N-bis(2-hydroxyethyl)-	28.470	60.00	300118	73416	0.478 %	
11	BENZENE, 1,1'-(ETHOXYMETHYLENE)	29.199	167.00	48714	15668	0.078 %	
12	Propanoic acid, 2-methyl-, 1-(1,1-dimethylet	29.462	71.00	263143	78280	0.419 %	
13	4-TERT-BUTYL-2-(1-METHYL-2-NITRO-	33.170	97.00	866102	263548	1.378 %	
14	Tetradecanoic acid (CAS) Myristic acid	34.257	73.00	882703	184748	1.405 %	
15	1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-methylp	36.384	149.00	636266	219854	1.013 %	
16	Pentadecanoic acid (CAS) Pentadecylic acid	36.928	73.00	626909	128448	0.998 %	
17	1,2-Benzenedicarboxylic acid, dibutyl ester (	38.787	149.00	28144195	5393012	44.788 %	
18	Pentadecanoic acid (CAS) Pentadecylic acid	39.726	73.00	6457596	564728	10.276 %	
19	Octadecanoic acid, methyl ester (CAS) Meth	43.430	74.00	324467	121720	0.516 %	
20	OCTADEC-9-ENOIC ACID	43.600	55.00	1399407	259659	2.227 %	
21	Octadecanoic acid (CAS) Stearic acid	44.041	73.00	464567	123983	0.739 %	
22	Hexadecanoic acid, butyl ester (CAS) n-Buty	44.434	56.00	350870	134996	0.558 %	
23	2-Propanoic acid, 3-(4-methoxyphenyl)-, 2-o	45.903	178.00	372557	153664	0.593 %	
24	Di-(2-ethylhexyl)phthalate	48.515	149.00	1680884	743845	2.675 %	
25	1,1-Diphenyl-2-cyano-2-carbo-octoxy-ethyl	49.527	204.00	211780	92556	0.337 %	

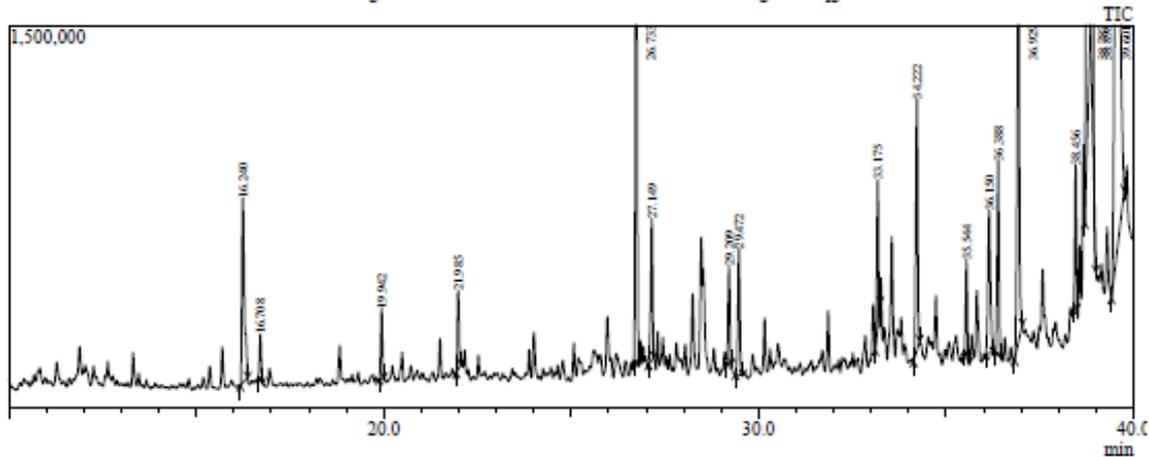
### 3.3. Ion Logam Al



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
LABORATORIUM SENTRAL ILMU HAYATI  
Jl Veteran, Malang 65143, Indonesia  
Telp/Fax: +62341 539054

http://lsh.ub.ac.id Email : laboratoriumsentral@Ub.ac.id ; laboratoriumsentral@gmail.com

Chromatogram Al D:\TUGAS AKHIR S2\Arbual Fauziah\Logam\Al.qgd



Quantitative Result Table

ID#	Name	R.Time	m/z	Area	Height	Conc.	Conc.Unit
1	Hexanal (CAS) n-Hexanal	3.654	43.00	1720226	246918	2.835 %	
2	2-Pentanol (CAS) Pentan-2-ol	3.924	45.00	8938515	1143228	14.732 %	
3	Benzothiazole (CAS) Vanguard BT	16.241	135.00	1085741	269004	1.789 %	
4	3-(2'-METHYLPROP-2'-ENYLIDENE)TEI	16.707	80.00	115797	32267	0.191 %	
5	Hexadecane (CAS) n-Hexadecane	19.941	71.00	197833	65353	0.326 %	
6	Benzaldehyde, 4-hydroxy-3-methoxy- (CAS)	21.985	152.00	328457	87713	0.541 %	
7	Phenol, 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methyl-	26.732	205.00	2217661	726650	3.655 %	
8	Hexadecane (CAS) n-Hexadecane	27.150	71.00	449551	131457	0.741 %	
9	BENZENE, 1,1-(ETHOXYMETHYLENE)I	29.206	167.00	144762	45290	0.239 %	
10	PHENYL-METHANE-1,1-DIOL DI-N-BUT	29.472	71.00	404871	123289	0.667 %	
11	4-TERT-BUTYL-2-(1-METHYL-2-NITRO-	33.174	57.00	471755	124882	0.778 %	
12	Tetradecanoic acid (CAS) Myristic acid	34.221	60.00	461020	111363	0.760 %	
13	3-Eicosane, (E)- (CAS)	35.545	57.00	147104	45724	0.242 %	
14	Octadecanoic acid (CAS) Stearic acid	36.150	57.00	251129	58559	0.414 %	
15	1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-methylp	36.388	149.00	1065313	333573	1.756 %	
16	Pentadecanoic acid (CAS) Pentadecylic acid	36.928	73.00	711775	164468	1.173 %	
17	Eicosane (CAS) n-Eicosane	38.456	57.00	526867	158157	0.868 %	
18	1,2-Benzenedicarboxylic acid, dibutyl ester (	38.785	149.00	26810084	7071982	44.187 %	
19	BICYCLO[2.2.1]HEPTAN, 2-[9-BORABIC	38.898	81.00	2040809	588546	3.364 %	
20	Hexadecanoic acid (CAS) Palmitic acid	39.601	73.00	3895820	559325	6.421 %	
21	Tritetracontane (CAS) N-TETRADECANON	41.129	57.00	578141	162106	0.953 %	
22	Pentacosane (CAS) n-Pentacosane	43.264	57.00	432514	169400	0.713 %	
23	2-Chloroethyl linoleate	43.367	67.00	747659	180848	1.232 %	
24	Hexadecanoic acid, butyl ester (CAS) n-But	44.430	56.00	731300	285989	1.205 %	
25	Eicosane (CAS) n-Eicosane	44.901	57.00	354769	153845	0.585 %	
26	N,N-DIMETYLPALMITAMIDE	45.181	87.00	718225	298486	1.184 %	
27	2-Propanoic acid, 3-(4-methoxyphenyl)-, 2-o	-	178.00	---	---	ND.(Ref) %	
28	Hexatriacontane (CAS) n-Hexatriacontane	46.252	57.00	252726	120521	0.417 %	
29	9-Octadecanamide, (Z)- (CAS) OLEOAMID	46.409	59.00	780841	294044	1.287 %	
30	Phenol, 2,2'-methylenebis[6-(1,1-dimethyl	-	177.00	---	---	ND.(Ref) %	
31	BENZOIC ACID 1-METHYL-HEPTYL ES	47.190	123.00	283905	127754	0.468 %	
32	Hexatriacontane (CAS) n-Hexatriacontane	47.416	57.00	155101	78697	0.256 %	
33	N,N-DIMETYLPALMITAMIDE	47.712	87.00	482838	210824	0.796 %	
34	Di-(2-ethylhexyl)phthalate	48.517	149.00	2439919	1174258	4.021 %	
35	1,1-Diphenyl-2-cyano-2-carbo-octoxy-ethyl	49.528	232.00	267628	122929	0.441 %	
36	Lycopodium	51.231	69.00	463295	214379	0.764 %	

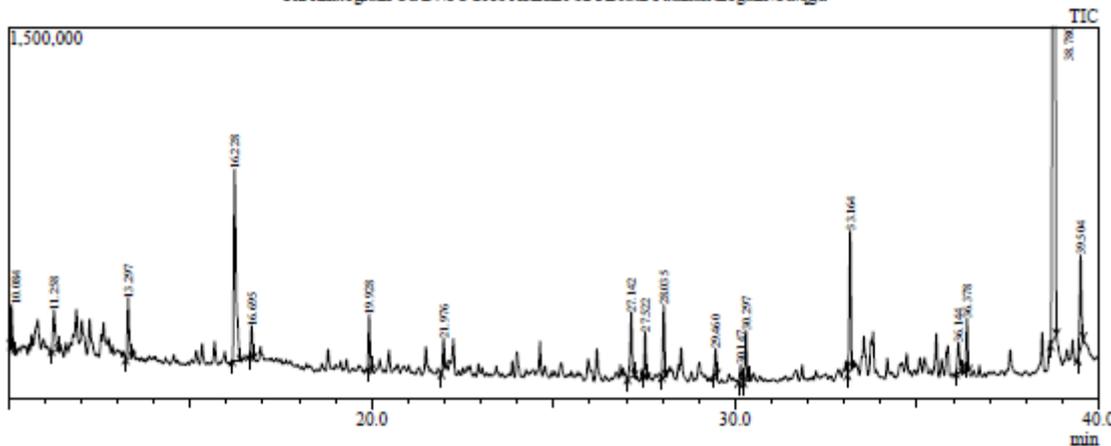
### 3.4. Ion Logam Cd



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
LABORATORIUM SENTRAL ILMU HAYATI  
Jl Veteran, Malang 65145, Indonesia  
Telp/Fax. +62341 559054

http://lsih.ub.ac.id Email : laboratoriumsentral@Ub.ac.id ; laboratoriumsentral@gmail.com

Chromatogram Cd D:\TUGAS AKHIR S2\Arbual Fauziah\Logam\Cd.qgd



Quantitative Result Table

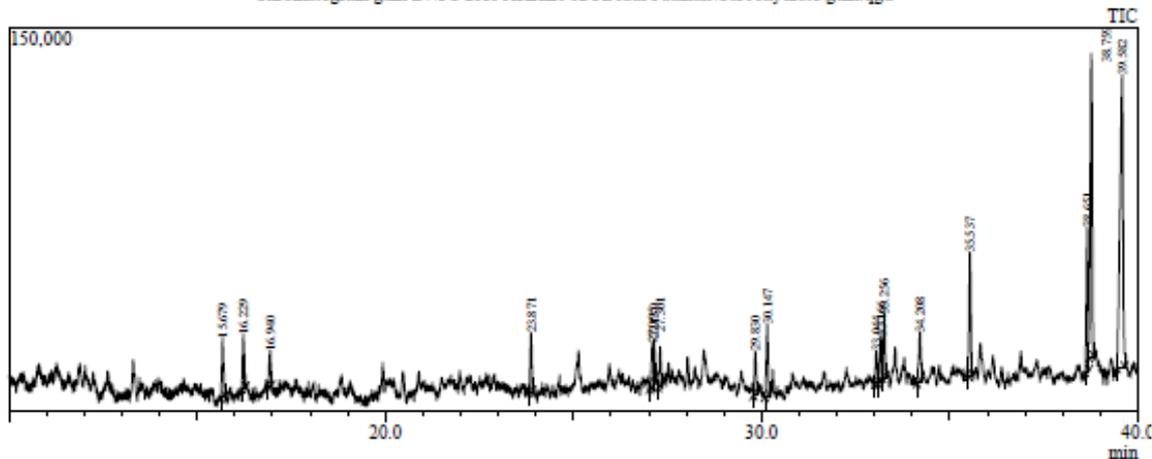
ID#	Name	R.Time	m/z	Area	Height	Conc.	Conc.Unit
1	2-Hexanone (CAS) Hexan-2-one	3.653	43.00	1972022	246975	6.111	ppm
2	2-Hexanol (CAS) n-C4H9CH(OH)CH3	3.913	45.00	8721607	968865	27.026	ppm
3	Cyclotrisiloxane, hexamethyl- (CAS) 1,1,3,3	4.754	207.00	1836320	266607	5.691	ppm
4	Hydroperoxide, 1-ethylbutyl (CAS) 3-Hexyl	7.617	43.00	465797	79681	1.444	ppm
5	1-Pentanol, 2,3-dimethyl-	7.895	43.00	269180	52131	0.834	ppm
6	Dodecane (CAS) n-Dodecane	9.754	57.00	181823	39366	0.563	ppm
7	Cyclotrisiloxane, octamethyl- (CAS) 1,1,3,3	10.083	281.00	323123	79523	1.001	ppm
8	Naphthalene, decalhydro- (CAS) Dec	11.260	67.00	132966	31580	0.412	ppm
9	Tridecane, 6-methyl- (CAS) 6-Methyltrideca	13.295	57.00	207358	56855	0.643	ppm
10	Benzothiazole (CAS) Vanguard BT	16.227	135.00	1004479	255707	3.113	ppm
11	(1-METHYL-PENTA-2,4-DIENYL)-BENZI	16.697	80.00	65356	17137	0.203	ppm
12	Heptadecane, 2,6,10,15-tetramethyl- (CAS)	19.929	57.00	168867	54312	0.523	ppm
13	Benzaldehyde, 4-hydroxy-3-methoxy- (CAS)	21.974	151.00	72732	22169	0.225	ppm
14	Hexadecane (CAS) n-Hexadecane	27.141	57.00	223699	55927	0.693	ppm
15	ALPHA SENEAL	27.523	91.00	56175	18893	0.174	ppm
16	1,5,9-Cyclododecatriene, 1,5,9-trimethyl- (C	28.036	68.00	163281	47176	0.506	ppm
17	3-(HYDROXY-PHENYL-METHYL)-3,+D	29.455	71.00	98661	29282	0.306	ppm
18	Dodecane, 2,6,10-trimethyl- (CAS) Farmsear	30.149	57.00	60012	20906	0.186	ppm
19	TRICYCLO[3.1.0.0(2,4)]HEXANE, 3,6-DI	30.297	93.00	81048	25937	0.251	ppm
20	4-TERT-BUTYL-2-(1-METHYL-2-NITRO-	33.166	97.00	379891	120545	1.177	ppm
21	D-GALACTIT, 1-O-OCTYL-	36.156	69.00	75766	17101	0.235	ppm
22	1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-methylp	36.379	149.00	241667	87697	0.749	ppm
23	1,2-Benzenedicarboxylic acid, dibutyl ester (	38.782	149.00	13394148	2845256	41.509	ppm
24	Pentadecanoic acid (CAS) Pentadecylic acid	39.504	57.00	138813	33607	0.430	ppm
25	Hexadecanoic acid, butyl ester (CAS) n-But	44.422	56.00	153521	93548	0.476	ppm
26	N,N-DIMETHYLPALMITAMIDE	45.173	87.00	252616	92705	0.783	ppm
27	Benzoic acid, heptyl ester (CAS) n-Heptyl bee	45.910	123.00	135267	57635	0.419	ppm
28	TETRACONTANE	46.246	57.00	110624	47187	0.343	ppm
29	9-Octadecanamide, (Z)- (CAS) OLEOAMID	46.387	59.00	72088	26773	0.223	ppm
30	Phenol, 2,2'-methylenebis[6-(1,1-dimethyl-1	-	177.00	-	-	N.D.(Ref)	ppm
31	Benzoic acid, heptyl ester (CAS) n-Heptyl bee	47.184	123.00	122489	46642	0.380	ppm
32	Triacontane (CAS) n-Triacontane	47.409	57.00	81102	40132	0.251	ppm
33	N,N-DIMETHYLPALMITAMIDE	47.705	87.00	153665	59881	0.476	ppm
34	Benzoic acid, heptyl ester (CAS) n-Heptyl bee	48.300	123.00	85901	39915	0.266	ppm
35	1,2-Benzenedicarboxylic acid, diisooctyl est	48.507	149.00	766271	310910	2.375	ppm

Lampiran 4. Kromatogram GC-MS Kalus Hasil Elisitasi dengan Karbohidrat  
4.1. Arabic Gum



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
LABORATORIUM SENTRAL ILMU HAYATI  
Jl Veteran, Malang 65145, Indonesia  
Telp/Fax. +62341 559054  
<http://lsh.ub.ac.id> Email : [laboratoriumsentral@Ub.ac.id](mailto:laboratoriumsentral@Ub.ac.id) ; [laboratoriumsentral@gmail.com](mailto:laboratoriumsentral@gmail.com)

Chromatogram gum D:TUGAS AKHIR S2(Arbau Fauziah)/Carbohydrate/gum.qgd



ID#	Name	R.Time	m/z	Area	Height	Conc.	Conc.Unit
1	Octane, 4-methyl- (CAS) 4-Methyloctane	7.471	43.00	71293	12789	5.334	ppm
2	Butane, 2-propoxy- (CAS) ETHER, 2-BUTYL	7.625	43.00	261809	41239	19.587	ppm
3	2-Hexanone, 3,3-dimethyl- (CAS) 3,3-DIME	7.916	43.00	288868	52863	21.611	ppm
4	4-HEXENOIC ACID, 2,2,5-TRIMETHYL-,	15.680	57.00	12547	3665	0.939	ppm
5	Benzothiazole (CAS) Vanguard BT	16.230	135.00	24971	6697	1.868	ppm
6	Decane, 2,6,7-trimethyl- (CAS)	16.937	57.00	11828	3912	0.883	ppm
7	Tridecane, 6-methyl- (CAS) 6-Methyltrideca	23.872	57.00	21462	7266	1.606	ppm
8	Undecane, 3,6-dimethyl- (CAS)	27.098	57.00	12357	4474	0.924	ppm
9	pentadecane	27.140	57.00	10240	3970	0.766	ppm
10	Dodecanoic acid, methyl ester (CAS) Methy	27.304	74.00	9165	3110	0.686	ppm
11	7-Hexadecane, (Z)- (CAS)	29.830	57.00	7028	2131	0.526	ppm
12	Hexadecane (CAS) n-Hexadecane	30.149	57.00	24165	7795	1.808	ppm
13	Hexadecane (CAS) n-Hexadecane	33.053	57.00	12292	3779	0.920	ppm
14	4-TERT-BUTYL-2-(1-METHYL-2-NITRO-	33.166	57.00	13393	3778	1.002	ppm
15	Tetradecanoic acid, methyl ester (CAS) Met	33.256	74.00	18307	5932	1.370	ppm
16	Tetradecanoic acid (CAS) Myristic acid	34.211	60.00	7371	2005	0.551	ppm
17	5-Octadecane, (E)- (CAS)	35.538	57.00	19719	6265	1.473	ppm
18	Hexadecanoic acid, methyl ester (CAS) Met	38.654	74.00	34862	10888	2.608	ppm
19	1,2-Benzenedicarboxylic acid, dibutyl ester (	38.756	149.00	249831	65548	18.691	ppm
20	Hexadecanoic acid (CAS) Palmitic acid	39.580	60.00	68206	11483	5.103	ppm
21	5-Eicosane, (E)- (CAS)	40.877	57.00	12389	3605	0.927	ppm
22	13-Octadecanoic acid, methyl ester (CAS) M	42.860	55.00	14402	5234	1.077	ppm
23	5-Eicosane, (E)- (CAS)	44.765	57.00	13454	5371	1.156	ppm
24	N,N-DIMETHYLPALMITAMIDE	45.177	87.00	29107	11314	2.178	ppm
25	7-NONENAMIDE	46.403	59.00	15494	6345	1.159	ppm
26	2-PYRIDINEACETONITRILE, ALPHA-(	-	209.00	---	---	N.D.(Ref)	ppm
27	2-PYRIDINEACETONITRILE, ALPHA-(	-	209.00	---	---	N.D.(Ref)	ppm
28	Phenol, 2,2'-methylenebis[6-(1,1-dimethylet	-	177.00	---	---	N.D.(Ref)	ppm
29	N,N-DIMETHYLPALMITAMIDE	47.713	87.00	11649	4923	0.872	ppm
30	1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-ethylhe	48.517	149.00	58446	27055	4.373	ppm



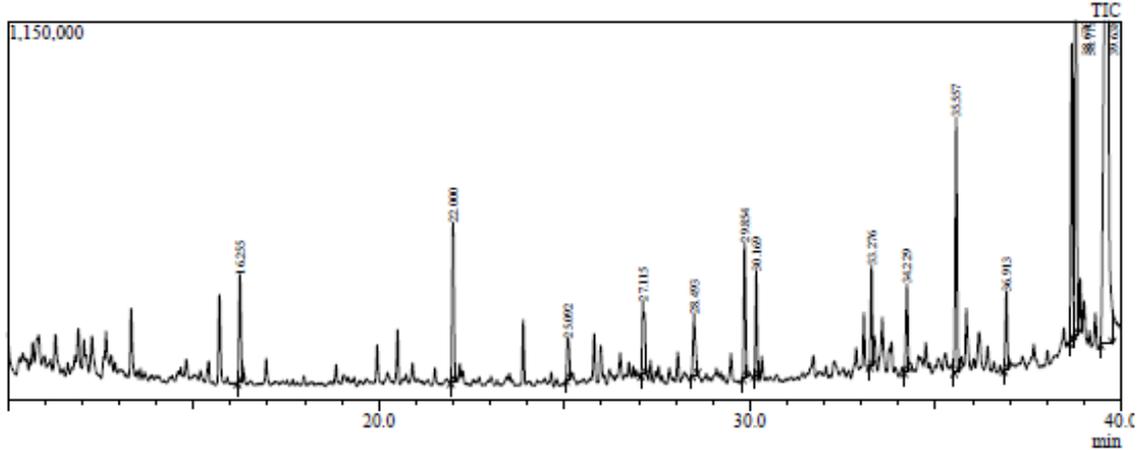
## 4.2. Kitosan



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI  
 UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
 LABORATORIUM SENTRAL ILMU HAYATI  
 Jl Veteran, Malang 65145, Indonesia  
 Telp/Fax. +62341 559054

http://lsh.ub.ac.id Email : laboratoriumsentral@Ub.ac.id ; laboratoriumsentral@gmail.com

Chromatogram chitosan D:\TUGAS AKHIR S2\Arbaul Fauziah\Carbohydrate\chitosan.qgd



Quantitative Result Table

ID#	Name	R.Time	m/z	Area	Height	Conc.	Conc.Unit
1	2,5-Hexanedione (CAS) Diacetyl	6.165	43.00	1260524	133406	5.157 %	
2	3-Pentanone (CAS) Diethyl ketone	6.888	57.00	391128	51814	1.600 %	
3	4-METHYL-1-OCTENE	7.496	43.00	1420997	261853	5.813 %	
4	Propane, 2-methyl-1-propoxy- (CAS) Ether	7.648	43.00	4632133	747196	18.950 %	
5	2-Hexanone, 3,3-dimethyl- (CAS) 3,3-DIME	7.940	43.00	4841011	910429	19.805 %	
6	HEXANE, 2-NITRO-	8.110	43.00	1210756	195443	4.953 %	
7	Benzothiazole (CAS) Vanguard BT	16.256	135.00	426817	111586	1.746 %	
8	Benzaldehyde, 4-hydroxy-3-methoxy- (CAS	21.999	152.00	442444	125500	1.810 %	
9	2-Nonyl-1-ol (CAS)	25.086	41.00	64575	14885	0.264 %	
10	Dodecane, 2,6,10-trimethyl- (CAS) Farnesat	27.116	57.00	219032	66666	0.896 %	
11	Dodecanamide, N,N-bis(2-hydroxyethyl)-	28.491	60.00	95480	25341	0.391 %	
12	Dodecane, 2,7,10-trimethyl- (CAS)	30.170	57.00	277974	91635	1.137 %	
13	Tetradecanoic acid, methyl ester (CAS) Meff	33.276	74.00	239731	75218	0.981 %	
14	Tetradecanoic acid (CAS) Myristic acid	34.231	60.00	127717	32497	0.522 %	
15	5-Octadecene, (E)- (CAS)	35.557	57.00	304712	92794	1.247 %	
16	Pentadecanoic acid (CAS) Pentadecylic acid	36.907	60.00	106775	26162	0.437 %	
17	Hexadecanoic acid, methyl ester (CAS) Meff	38.670	74.00	722747	216250	2.957 %	
18	1,2-Benzenedicarboxylic acid, dibutyl ester (	38.780	149.00	3125509	902057	12.787 %	
19	Hexadecanoic acid (CAS) Palmitic acid	39.639	60.00	1753749	242613	7.175 %	
20	5-Eicosene, (E)- (CAS)	40.895	57.00	254171	71747	1.040 %	
21	13-Octadecenoic acid, methyl ester (CAS) M	42.879	55.00	278073	97405	1.138 %	
22	5-Eicosene, (E)- (CAS)	44.777	57.00	296362	109987	1.212 %	
23	N,N-DIMETHYLPALMITAMIDE	45.190	87.00	363393	142763	1.487 %	
24	7-NONENAMIDE	46.414	59.00	319622	132179	1.308 %	
25	Phenol, 2,2'-methylenebis[6-(1,1-dimethylet	47.031	177.00	400546	160631	1.639 %	
26	5-Eicosene, (E)- (CAS)	47.334	57.00	84509	38662	0.346 %	
27	N,N-DIMETHYLPALMITAMIDE	47.720	87.00	152083	67365	0.622 %	
28	1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-ethylhe	48.527	149.00	631127	285777	2.582 %	

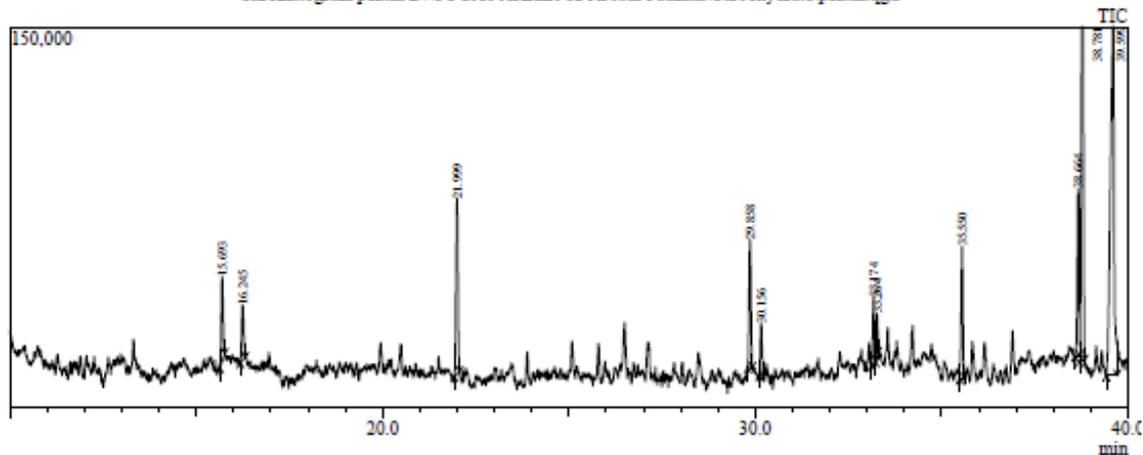
### 4.3. Pektin



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI  
 UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
 LABORATORIUM SENTRAL ILMU HAYATI  
 Jl Veteran, Malang 65145, Indonesia  
 Telp/Fax. +62341 559054

http://sih.ub.ac.id Email : laboratoriumsentral@Ub.ac.id ; laboratoriumsentral@gmail.com

Chromatogram pektin D:\TUGAS AKHIR S2\Arbaul Fauziah\Carbohydrate\pektin.qgd



Quantitative Result Table

ID#	Name	R.Time	m/z	Area	Height	Conc.	Conc.Unit
1	2-Hexanone (CAS) Hexan-2-one	3.643	43.00	193973	25137	10.027 %	
2	2-Pentanol (CAS) Pentan-2-ol	3.923	45.00	308057	36568	15.762 %	
3	Octane, 4-methyl- (CAS) 4-Methyloctane	7.482	43.00	85012	15397	4.350 %	
4	Propane, 2-methyl-1-propoxy- (CAS) Ether,	7.637	43.00	191113	30256	9.778 %	
5	2-Hexanone, 3,3-dimethyl- (CAS) 3,3-DIME	7.927	43.00	197994	35433	10.131 %	
6	HEXANE, 2-NITRO-	8.102	43.00	83057	12160	4.250 %	
7	4-HEXENOIC ACID, 2,2,5-TRIMETHYL-,	15.694	57.00	21015	6014	1.075 %	
8	Benzothiazole (CAS) Vanguard BT	16.246	135.00	28685	7229	1.468 %	
9	Benzaldehyde, 4-hydroxy-3-methoxy- (CAS)	21.999	152.00	56883	16183	2.910 %	
10	1,3-BENZODIOXOL, 5-HYDROXYMETH	29.864	197.00	27530	7709	1.409 %	
11	Hexadecane (CAS) n-Hexadecane	30.159	57.00	19355	6197	0.990 %	
12	4-TERT-BUTYL-2-(1-METHYL-2-NITRO-	33.176	57.00	22295	6439	1.141 %	
13	Tetradecanoic acid, methyl ester (CAS) Met	33.264	74.00	14578	4751	0.746 %	
14	5-Octadecane, (E)- (CAS)	35.548	57.00	20763	6600	1.062 %	
15	Hexadecanoic acid, methyl ester (CAS) Met	38.663	74.00	42884	13598	2.194 %	
16	1,2-Benzenedicarboxylic acid, dibutyl ester (	38.782	149.00	355328	90993	18.181 %	
17	Hexadecanoic acid (CAS) Palmitic acid	39.600	60.00	89111	14537	4.559 %	
18	5-Eicosene, (E)- (CAS)	40.890	57.00	12778	3715	0.654 %	
19	13-Octadecenoic acid, methyl ester (CAS) M	42.867	55.00	17018	5956	0.871 %	
20	5-Eicosene, (E)- (CAS)	44.772	57.00	19074	6182	0.976 %	
21	N,N-DIMETHYLPALMITAMIDE	45.183	87.00	34931	13933	1.787 %	
22	Octadecane, 3-methyl- (CAS) 3-Methyloctane	46.255	57.00	5866	2548	0.300 %	
23	9-Octadecanamide, (Z)- (CAS) OLEOAMID	46.407	59.00	10276	4059	0.526 %	
24	2-PYRIDINEACETONITRILE, ALPHA,-(	-	209.00	-	-	N.D.(Ref) %	
25	2,4-Di(1-phenylethyl)phenol	-	209.00	-	-	N.D.(Ref) %	
26	Phenol, 2,2'-methylselenbis[6-(1,1-dimethyl	47.030	177.00	47363	17265	2.423 %	
27	N,N-DIMETHYLPALMITAMIDE	47.718	87.00	12268	5557	0.628 %	
28	1,2-Benzenedicarboxylic acid, diisooctyl est	48.521	149.00	35214	16585	1.802 %	



Lampiran 5. Sertifikat Bebas Plagiasi

**plagiarism detector**  
Cutting-edge class tool for plagiarism detection and prevention

**KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI**  
**UNIVERSITAS BRAWIJAYA**  
**PASCASARJANA**

17-0487-T

**SERTIFIKAT BEBAS PLAGIASI**  
Nomor: 3907/UN10.F40.08/PN/2017  
Sertifikat ini diberikan kepada:

**Arbaul Fauziah**  
Dengan Judul Tesis  
Peningkatan Kandungan Vetiver Oil pada Kultur Kalus Akar Wangi (*Vetiveria zizanioides* (L.) Nash) melalui Elisitasi dengan Ion Logam (Cd, Al, Pb) dan Karbohidrat (Pektin, Kitosan, Arabic Gum)  
Telah dideteksi tingkat plagiasinya dengan kriteria toleransi  $\leq 5\%$ , dan dinyatakan Bebas dari Plagiasi.

Malang, 12 Desember 2017  
Ketua Tim Deteksi Plagiasi

Prof. Dr. Abdul Hakim, M.Si  
NIP. 19610202 198503 1 006

Indah Yanti, S.Si., M.Si  
NIP. 19791129 200501 2 002