

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Penelitian

Indonesia dikenal secara luas sebagai negara yang kaya akan keanekaragaman hayati terbesar di dunia kedua setelah negara Brazil. Di wilayah Indonesia terdapat sekitar 30.000 jenis tumbuhan dan 7.000 di antaranya dipercayai memiliki khasiat sebagai obat. Kekayaan keanekaragaman hayati ini perlu diteliti, dikembangkan dan dimanfaatkan untuk peningkatan kesehatan maupun tujuan ekonomi, dengan tetap menjaga kelestariannya (Sampurno, 2013). Menurut riset kesehatan dasar tahun 2010 yang dilakukan oleh Kementerian Kesehatan menunjukkan bahwa 59,12 % penduduk pernah mengkonsumsi obat tradisional dan 95 % dari jumlah tersebut mengakui manfaat ramuan tradisional tersebut untuk kesehatan (Kompas, 2012).

Morinda citrifolia L. atau mengkudu merupakan salah satu tanaman yang secara luas digunakan sebagai obat herbal di Indonesia (Kompas, 2012). Beberapa produk herbal dari olahan buah mengkudu secara luas telah dipasarkan di Indonesia baik itu berupa kopi, teh, jus, kapsul dan beberapa dijadikan sebagai bahan baku kosmetik. *Morinda citrifolia* L. atau mengkudu merupakan tanaman asli yang berasal dari Asia Tenggara (Indonesia) dan Australia (Nelson, 2003; Rosalizan, *et al.* 2010). Tanaman ini juga telah lama digunakan sebagai tanaman obat di daerah Polinesia (India) kurang lebih selama 2000 tahun (Wang, *et al.* 2002). Nerurkar *et al.* (2015) melaporkan bahwa beberapa organ tanaman mengkudu seperti akar, buah, daun, dan batang memiliki berbagai macam khasiat. Bagian akar tanaman mengkudu digunakan secara tradisional untuk mengobati infeksi dan sakit perut. Bagian buah digunakan sebagai obat bisul, jerawat, gigitan serangga, TBC, diabetes dll. Bagian daun digunakan untuk mengobati luka bakar, sakit kepala, demam, kram menstruasi, nyeri punggung, bisul, nyeri rematik, maag, asam urat, mengobati gigitan serangga, penyakit kulit serta penyakit syaraf dan bagian batang digunakan untuk mengobati penyakit hernia.

Sifat-sifat terapeutik atau sifat obat dari tanaman disebabkan oleh adanya kandungan senyawa bioaktif (Mathivanan *et al.*, 2005). Senyawa bioaktif kebanyakan merupakan senyawa metabolit sekunder. Secara ilmiah, dilaporkan bahwa *Morinda citrifolia* L. memiliki kandungan senyawa metabolit sekunder yang bernakeragam. Dalam jurnalnya, Desmukh, *et al.* (2011) melaporkan bahwa kandungan senyawa fenolik, flavonoid dan antrakuinon merupakan kelompok utama dari metabolit sekunder yang sebagian besar bertanggung jawab pada semua sifat terapeutik dari mengkudu. Senyawa metabolit sekunder tersebut memiliki efek anti-bakteri, anti-kanker, anti-jamur, anti-virus, anti-tumor, anti-helmintik, analgesik dan anti-inflamasi (Setyawaty, *et al.*, 2014; Baque, *et al.*, 2012).

Dalam penelitiannya, Hutomo *et al.* (2005) membuktikan bahwa ekstrak buah mengkudu dengan pelarut alkohol 70% pada dosis 200 mg/kg dan 150 mg/kg BB, dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme penyebab malaria, *Plasmodium berghei*. Hal tersebut dapat dilihat dari menurunnya angka parasitemia dan meningkatnya jumlah makrofag pada hewan uji. Selain itu, mengkudu juga memiliki sifat larvasida. Kandungan alkaloid, saponin, terpenoid, proxeronin, dan asam oktanoat pada mengkudu merupakan senyawa-senyawa yang dapat menghambat proses larva menjadi pupa (Nisa, *et al.*, 2015). Devi & Krishna (2013) dalam penelitiannya melaporkan bahwa hasil ekstraksi alkoholik batang *Morinda citrifolia* L. menunjukkan adanya aktivitas anti-fungi, anti-bakteri yang lebih tinggi dibandingkan dengan obat standarnya yaitu tetrasiklin. Metode yang digunakan dalam penelitian tersebut adalah metode difusi cakram.

Metabolit sekunder dapat diperoleh dengan cara mengekstraksi langsung dari organ tanaman dewasa (Purwianingsih & Hamdiyati, 2009; Arif, 2011). Namun, penggunaan tanaman dalam produksi senyawa yang diinginkan secara terus menerus dapat berpengaruh pada ketersediaan species tanaman tersebut dan tentunya dibutuhkan budidaya tanaman dalam skala besar sehingga dibutuhkan lahan yang luas dan biaya yang mahal (Ningsih, 2014). Oleh karena itu, dibutuhkan metode alternatif yang efektif untuk mengakumulasi metabolit

sekunder sehingga menghasilkan jumlah yang sama bahkan lebih banyak dibandingkan dari tanaman induknya.

Senyawa metabolit sekunder pada tanaman dapat diakumulasi dengan teknik kultur jaringan secara *in vitro*. Perkembangan terbaru teknik kultur jaringan tanaman, terbukti dapat meningkatkan produktivitas berkali-kali lipat jumlahnya dibandingkan dengan yang dihasilkan oleh tanaman induknya. Selain itu, kultur jaringan juga memiliki banyak keuntungan antara lain tidak tergantung pada faktor lingkungan, sistem produksinya dapat diatur, tidak memerlukan banyak lahan dan proses pemurniannya lebih mudah karena sel-sel hasil kultur jaringan tidak mengandung banyak pigmen (Ariningsih, *et al.*, 2003; Purwianingsih & Hamdiyati, 2009). Kultur *in-vitro* juga lebih ekonomis untuk tanaman yang memerlukan waktu lama untuk mencapai usia produktif.

Langkah pertama yang dilakukan dalam kultur jaringan pada umumnya adalah induksi kalus. Kalus merupakan suatu kumpulan sel yang membelah diri secara terus-menerus dan belum berdiferensiasi. Kalus dapat diperoleh dari bagian-bagian tanaman seperti batang, daun atau akar yang ditanam pada medium pertumbuhan. Kalus yang dihasilkan dari kultur jaringan memiliki sifat totipotensi, artinya setiap sel yang dihasilkan berpotensi menghasilkan senyawa-senyawa yang diproduksi oleh tanaman induknya. Keberhasilan dalam menghasilkan kalus bergantung pada beberapa faktor yaitu pemilihan eksplan, ketepatan pemilihan zat pengatur tumbuh, kondisi lingkungan kultur dan jenis media (Dixon dan Gonzales, 2003 dalam Kusumawati *et al.*, 2015; Ajjiah, *et al.*, 2010).

Zat pengatur tumbuh (ZPT) merupakan faktor utama yang mengontrol pembentukan kalus. Zat pengatur tumbuh (ZPT) yang biasa digunakan untuk induksi kalus pada umumnya adalah kombinasi auksin dan sitokinin. Kombinasi auksin dan sitokinin yang seimbang di dalam sel dapat merangsang pembentukan kalus. ZPT eksogen yang diberikan berfungsi untuk meningkatkan konsentrasi ZPT endogen sel, memicu proses tumbuh dan perkembangan jaringan (Sitinjak, *et al.*, 2015). Auksin 2,4-D merupakan auksin yang secara umum digunakan untuk induksi kalus. Auksin 2,4-D ini dapat merangsang aktivitas kalus untuk

berdiferensiasi, menekan organogenesis dan menjaga pertumbuhan kalus (Papry, *et al.*, 2015). Auksin 2,4-D ini dapat dikombinasikan dengan sitokinin seperti BAP ataupun kinetin. Penambahan sitokinin pada induksi kalus menstimulasi terjadinya pembelahan dan poliferasi kalus serta menaikkan laju sintesis protein yang mendorong pembelahan dan pembesaran sel (Rosyidah, *et al.*, 2014). Ahmed, *et al.* (2008), menggunakan kombinasi 2,4-D (2 mg/l) dan kinetin (1 mg/l) untuk menginduksi kalus dari daun *Morinda citrifolia* L.. Kalus-kalus yang dihasilkan dari kombinasi tersebut dianalisis secara kualitatif dengan menggunakan spektrofotometer. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kalus-kalus yang dianalisis dapat menghasilkan senyawa metabolit sekunder fenolik, flavonoid dan antrakuinon.

Pandey, *et al.* (2013) melaporkan bahwa kombinasi 2,4-D (18 μ M) dan kinetin (2,0 μ M) memberikan pengaruh terhadap induksi kalus dari eksplan daun, tunas dan akar *Psoralea corylifolia*. Kombinasi 2,4-D dan kinetin yang diberikan dapat menginduksi pertumbuhan kalus mencapai 95 % pada eksplan daun. Begitu pula Wardani, *et al.* (2004) melaporkan bahwa kombinasi 2-4-D (0-1,5 mg/l) dan kinetin (0-1,5 mg/l) memberikan pengaruh terhadap induksi kalus dari daun *Talinum paniculatum* Gaertn.. Kombinasi 2,4-D (1,5 mg/l) dan kinetin (1,5 mg/l) memberikan pengaruh yang paling tinggi terhadap pembentukan kalus dan produksi senyawa saponin.

Selain zat pengatur tumbuh, jenis eksplan yang digunakan dapat berpengaruh pula terhadap respon pembentukan kalus (Noviati, *et al.*, 2012). Pemilihan eksplan akan bergantung pada tujuan pengkulturan atau respon yang diinginkan dari kultur jaringan. Eksplan yang sebaiknya digunakan untuk tujuan induksi kalus adalah potongan kotiledon, hipokotil, batang atau daun. Umur fisiologis eksplan yang lebih muda umumnya akan lebih responsif terhadap rangsangan pembentukan kalus (Smith, 2013).

Kusumawati, *et al.* (2015) menggunakan eksplan daun yang berasal dari kecambah berumur 25 hari untuk menginduksi kalus dari *Morinda citrifolia* L.. Dari hasil penelitian ditemukan bahwa eksplan mulai mengalami pembengkakan pada hari ke-7 dan mulai tumbuh kalus pada hari ke-9 setelah masa tanam. Begitu

pula Purwianingsih dan Hamdiyati (2009) menggunakan eksplan daun dari kecambah yang berumur 1,5 bulan untuk menginduksi kalus dari *Morinda citrifolia* L. Hasilnya, kalus terbentuk setelah 7 hari masa tanam. Diperlukan metode yang tepat serta waktu yang cukup lama untuk memperoleh eksplan dari kecambah yang diinginkan. Oleh karena itu, diperlukan alternatif eksplan lain yang dapat diperoleh secara cepat dan masih memiliki umur eksplan yang relatif muda salah satunya adalah daun dan batang muda yang dicuplik dari tanaman dewasa yang tumbuh di lingkungan terbuka. Namun, eksplan yang diperoleh dari tanaman dewasa memiliki tingkat kontaminasi mikroorganisme yang cukup tinggi (Smith, 2013).

Jenis eksplan yang digunakan akan berpengaruh pula terhadap produksi metabolit sekunder pada kalus yang dihasilkan (Noviati, *et al.*, 2012; Maharik, *et al.*, 2009). Akumulasi metabolit sekunder pada tiap organ tanaman pun dapat berbeda. Noviati *et al.* (2012) meneliti tentang produksi antioksidan asam askorbat dan karoten pada kalus yang dihasilkan dari eksplan daun, tangkai daun dan kelopak bunga Rosela (*Hibiscus sabdariffa*). Dari hasil penelitian ditemukan bahwa asam askorbat lebih banyak dihasilkan oleh kalus dari eksplan daun dan karoten lebih banyak dihasilkan oleh kalus dari eksplan kelopak bunga. Daun dapat mengakumulasi kandungan asam askorbat lebih banyak karena daun merupakan organ fotosintetik utama yang dapat menyediakan karbohidrat sebagai senyawa prazat dalam pembentukan asam askorbat. Kelopak bunga dapat mengakumulasi karoten lebih banyak karena kelopak bunga merupakan modifikasi dari daun dengan fungsi spesifik yaitu sebagai penimbun karotenoid. Hal yang sama ditemukan pula oleh Maharik, *et al.* (2009) yang meneliti tentang produksi senyawa antosianin pada kalus yang dihasilkan dari eksplan daun dan batang. Hasilnya menunjukkan bahwa kalus dari eksplan batang dapat mengakumulasi antosianin lebih banyak dibandingkan kalus dari eksplan daun.

Ariningsih, *et al.* (2003) telah mencoba untuk menginduksi dan menganalisis kandungan antrakuinon pada kalus yang berasal dari daun muda *Morinda citrifolia* L. dewasa. Namun, belum ada penelitian yang melaporkan hasil induksi maupun analisis metabolit sekunder dari kalus yang berasal dari

daun maupun batang muda dewasa *Morinda citrifolia* L.. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis kandungan metabolit sekunder fenolik dan antrakuinon pada kalus *Morinda citrifolia* L. yang dihasilkan dari eksplan daun dan batang. Dalam penelitian ini digunakan kombinasi 2,4-D (1-1,75 mg/l) dan kinetin (1-1,5 mg/l) untuk menginduksi kalus dari kedua eksplan tersebut. Parameter yang diamati dari penelitian ini adalah waktu inisiasi kalus, rerata pertambahan berat basah kalus (mg/hari), morfologi kalus dan hasil uji kualitatif senyawa fenolik dan antrakuinon.

B. Rumusan Masalah

Adapun rumusan masalah dari penelitian ini adalah “Bagaimana hasil analisis kualitatif kandungan metabolit sekunder (fenolik dan antrakuinon) pada kalus yang ditumbuhkan dari eksplan daun dan batang *Morinda citrifolia* L.?”.

Dari rumusan tersebut dapat dibuat menjadi beberapa pertanyaan penelitian yaitu :

1. Bagaimana pertumbuhan kalus yang diinisiasi dari eksplan daun ?
2. Bagaimana pertumbuhan kalus yang diinisiasi dari eksplan batang?
3. Bagaimana morfologi kalus yang diinisiasi dari eksplan daun?
4. Bagaimana morfologi kalus yang diinisiasi dari eksplan batang?
5. Apakah terdapat metabolit sekunder fenolik dan antrakuinon pada kalus yang ditumbuhkan dari eksplan daun dan batang?

C. Tujuan Penelitian

Penelitian ini memiliki tujuan sebagai berikut.

1. Untuk mengetahui pertumbuhan kalus yang diinisiasi dari eksplan daun.
2. Untuk mengetahui pertumbuhan kalus yang diinisiasi dari eksplan batang.
3. Untuk mengetahui morfologi kalus yang diinisiasi dari eksplan daun.
4. Untuk mengetahui morfologi kalus yang diinisiasi dari eksplan batang.
5. Untuk mengetahui kandungan metabolit sekunder fenolik dan antrakuinon pada kalus yang ditumbuhkan dari eksplan daun dan batang

D. Manfaat Penelitian

1. Manfaat teoritis

Nursolihat, 2016

**ANALISIS METABOLIT SEKUNDER KALUS HASIL KULTUR EKSPLAN DAUN DAN BATANG
MENGKUDU**

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

- a) Memberikan tambahan referensi terkait metode induksi kalus dari eksplan daun dan batang *Morinda citrifolia* dewasa.
- b) Memberikan tambahan referensi mengenai tipe-tipe kalus yang dihasilkan dari induksi menggunakan eksplan daun dan batang *Morinda citrifolia* L..
- c) Memberikan tambahan referensi mengenai ada tidaknya kandungan senyawa fenolik dan antrakuinon secara kualitatif pada kalus daun dan batang *Morinda citrifolia* L..

2. Manfaat praktis

Kalus-kalus yang dihasilkan dari hasil induksi menggunakan eksplan daun dan batang dapat digunakan untuk penelitian selanjutnya seperti akumulasi senyawa metabolit sekunder dengan menggunakan elisitor, somatik embriogenesis, inisiasi tunas, inisiasi akar, atau untuk kepentingan rekayasa genetika tanaman bergantung kepada tipe kalus yang dihasilkan.

E. Batasan Masalah

1. Eksplan yang digunakan adalah eksplan batang muda *Morinda citrifolia* L. dewasa, 10 cm di bawah pucuk, belum keras dan berkayu, berasal dari pohon yang berada di parkir gate 2 Universitas Pendidikan Indonesia (UPI).
2. Eksplan daun yang digunakan adalah daun ke -2 dan 3 dari pucuk *Morinda citrifolia* L. yang masih berwarna hijau muda dan berasal dari pohon yang berada di parkir gate 2 Universitas Pendidikan Indonesia (UPI).
3. Eksplan untuk induksi kalus ditumbuhkan pada medium MS (Murashige & Skoog) padat.
4. ZPT 2,4 D yang digunakan adalah 1, 1.25, 1.5 dan 1.75 mg/L. Sedangkan ZPT kinetin yang digunakan adalah 1, 1.25 dan 1.5 mg/L.
5. Kandungan senyawa metabolit sekunder yang dianalisis secara kualitatif adalah senyawa fenolik dan antrakuinon.

F. Asumsi

1. Potongan eksplan yang berasal dari jaringan daun dan batang *Morinda citrifolia* L. akan menghasilkan kalus dengan morfologi yang heterogen (Pierik, 1987). Daun tersusun atas jaringan mesofil (palisade dan bunga karang), sedangkan batang disusun oleh sel-sel korteks, jaringan pengangkut dan empulur (Wulandari, 2004; Noviati, *et al.*, 2012).
2. Sifat totipotensi sel memungkinkan sel somatik tumbuhan memiliki kapasitas untuk beregenerasi menjadi tanaman yang utuh, asalkan sel memiliki intisel, plastida dan genom mitokondria yang utuh (Vasil & Vasil, 1972).

Nursolihat, 2016

**ANALISIS METABOLIT SEKUNDER KALUS HASIL KULTUR EKSPLAN DAUN DAN BATANG
MENGKUDU**

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

Kemampuan totipotensi ini juga memungkinkan setiap sel untuk memproduksi setiap zat yang dihasilkan oleh induknya. Jadi, sel dari jaringan daun dan batang *Morinda citrifolia* L. memungkinkan untuk memproduksi senyawa fenolik dan antrakuinon.

3. Senyawa fenolik merupakan senyawa metabolit sekunder yang paling melimpah pada tumbuhan tinggi (Dai & Mumper, 2010). *Morinda citrifolia* L. mengandung senyawa fenolik dan antrakuinon (Baque, *et al.*, 2012).
4. Dari beberapa anggota senyawa kuinon, antrakuinon merupakan senyawa yang jumlahnya paling melimpah baik pada tanaman tinggi ataupun tanaman rendah (Vermerris & Nicholson, 2006). Senyawa antrakuinon paling banyak terdapat pada familia Rubiaceae salah satunya adalah *Morinda citrifolia* L. (Korulkin & Muzychkina, 2014).

G. Struktur Organisasi

Bab I memuat alasan penulis memilih tanaman *Morinda citrifolia* L. sebagai sumber senyawa bioaktif yang dikembangkan dengan menggunakan metode kultur jaringan dilengkapi dengan kandungan dan manfaatnya. Selain itu, bab ini juga memuat tentang kelebihan metode kultur jaringan, cara-cara yang dapat dikembangkan dari metode ini serta memuat alasan penulis memilih poin pengaruh perbedaan eksplan dan kombinasi 2,4-D: kinetin terhadap waktu inisiasi, rerata penambahan berat basah (mg/hari) serta kandungan senyawa fenolik dan antrakuinon secara kualitatif untuk dijadikan objek penelitian.

Bab II memuat mengenai teori-teori pendukung yang relevan dari setiap poin penting sub judul penelitian. Bab ini memuat penjelasan mengenai *Morinda citrifolia* L., kultur jaringan, kalus, senyawa fenolik dan antrakuinon, ekstraksi senyawa metabolit sekunder beserta analisis kualitatif sederhana yang dapat dilakukan untuk mendeteksi adanya kandungan senyawa fenolik dan antrakuinon.

Bab III memuat tentang metode penelitian atau langkah-langkah yang dilakukan dalam penelitian dari mulai tahap persiapan sampai tahap analisis kualitatifnya. Secara ringkas tahapannya terdiri persiapan alat dan bahan,

persiapan medium, sterilisasi, induksi kalus, ekstraksi serta analisis kandungan metabolit sekunder secara kualitatif.

Bab IV memuat tentang temuan dari penelitian serta pembahasan mengenai hasil temuan penelitian tersebut. Secara garis besar, temuan dalam penelitian ini adalah mengenai pengaruh perbedaan eksplan dan kombinasi 2,4-D: kinetin terhadap waktu inisiasi kalus, rerata pertambahan berat segar kalus (mg/hari), morfologi kalus serta kandungan metabolit sekundernya. Berdasarkan hasil temuan, dapat diketahui bahwa setiap eksplan memberikan hasil yang berbeda terhadap parameter-parameter yang ditentukan.

Bab V memuat tentang simpulan, implikasi dan rekomendasi yang ditemukan berdasarkan hasil temuan dan pembahasan penelitian. Simpulan berisi tentang eksplan *Morinda citrifolia* L. yang memberikan respon paling baik terhadap waktu inisiasi kalus, rerata pertambahan berat segar kalus (mg/hari), morfologi kalus serta kandungan metabolit sekundernya. Implikasi memuat penerapan hasil penelitian dalam kehidupan nyata dan rekomendasi berisi saran-saran peneliti terhadap penelitian-penelitian yang bisa dilanjutkan serta saran perbaikan beberapa metode penelitian berdasarkan hasil temuan peneliti.