

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Penelitian

Banyak tanaman tinggi merupakan sumber utama produk alami yang digunakan dalam bahan farmasi, agrokimia, rasa, bahan wewangian, aditif makanan, dan pestisida. Ciri khas tanaman adalah memiliki kemampuan untuk mensintesis dan menyimpan berbagai macam senyawa dengan berat molekul rendah, yang disebut metabolit sekunder atau produk alami (Wink, 2010). Metabolit sekunder dianggap sebagai produk limbah atau senyawa yang tidak berguna selama bertahun-tahun, namun selama tiga dekade terakhir telah terbukti memiliki peran penting bagi tanaman yang memproduksinya, di antaranya diperlukan untuk kelangsungan hidup tanaman tetapi tidak diperlukan untuk pertumbuhan tanaman (Wink, 2010). Metabolit sekunder mempunyai sifat biologis dan farmakologis yang menarik sehingga berguna untuk pengobatan (Wink, 2010). Metabolit sekunder telah digunakan sebagai bahan obat tradisional selama berabad-abad dikarenakan aktivitas biologis utama yang ditunjukkan tersebut (Bourgaud, dkk., 2001).

Sumber utama dari sejumlah besar senyawa bioaktif yang biasa digunakan sebagai bahan obat-obatan berasal dari tanaman (Mathivanan, dkk., 2005). Tanaman merupakan sumber penting metabolit sekunder dan berperan penting dalam kesehatan dunia. Produk tumbuhan secara alami telah menjadi bagian penting dalam pengobatan sepanjang sejarah manusia (Gorelick & Bernstein, 2014). Indonesia merupakan negara tropis dengan potensi tanaman yang secara turun temurun digunakan sebagai obat tradisional. Sekitar 30.000 spesies tumbuhan hidup di kepulauan Indonesia, diketahui sekurang-kurangnya 9.600 spesies tumbuhan berkhasiat obat dan kurang lebih dari 300 spesies telah digunakan sebagai bahan obat tradisional oleh industri obat tradisional (Aeni, 2017). Salah satu sumber tanaman obat yang banyak digunakan adalah *Morinda citrifolia* (L.). Mengkudu merupakan tanaman obat yang sangat populer di kalangan masyarakat. Mengkudu telah digunakan dalam pengobatan tradisional oleh orang Polinesia selama lebih dari 2000 tahun, dan dilaporkan memiliki berbagai efek terapeutik, termasuk antibakteri, antiviral, antijamur, antitumor, anti-HIV, antihelmin,

analgesik, hipotensi, anti-inflamasi, dan efek peningkatan kekebalan tubuh (Siddiqui, dkk., 2006).

Beberapa penelitian yang telah dilakukan, dapat diketahui bahwa hampir semua bagian tanaman mengkudu mengandung zat kimia dan nutrisi yang dapat berguna bagi kesehatan (Rukmana, 2002). Studi kimia pada *Morinda citrifolia* dimulai pada tahun 1907 ketika Oesterle mengisolasi turunan antrakuinon ($C_{16}H_{12}O_5$) dari batang *Morinda citrifolia* (Siddiqui, dkk., 2006). Dalam mengkudu telah teridentifikasi lebih dari 70 senyawa bioaktif. Senyawa-senyawa bioaktif tersebut tersebar dalam berbagai organ seperti akar, daun dan buah, serta dari sekian banyak senyawa bioaktif ada beberapa yang dianggap penting di antaranya antrakuinon (golongan kuinon), skopoletin (golongan alkaloid), asam askorbat (vitamin), β -karotin, arginin, proseronin dan proseroninase yang merupakan prekursor dari seronin (golongan alkaloid) (Wang, dkk., 2002). Meskipun kandungan senyawa bioaktif sangat beranekaragam, namun ada senyawa yang ditemukan paling banyak pada genus *Morinda* yaitu antrakuinon (Phakhodee, 2012)

Beberapa penelitian telah dilakukan dan melaporkan bahwa dalam mengkudu terkandung zat kimia antrakuinon. Purwianingsih & Hamdiyati (2007) melaporkan bahwa dalam mengkudu terkandung senyawa bioaktif antrakuinon. Baque, dkk. (2012) juga melaporkan bahwa pada akar mengkudu terkandung senyawa kimia antrakuinon, begitupun hasil penelitian Nursolihat (2016) yang melaporkan bahwa pada batang, serta daun mengkudu terkandung senyawa kimia antrakuinon.

Antrakuinon merupakan kelompok penting metabolit sekunder yang ada pada bakteri, jamur, lumut dan tanaman tinggi (Brown & Brown, 1976; Mori, dkk., 1990; Butterworth, dkk., 2001). Antrakuinon banyak digunakan di bidang industri dan obat-obatan untuk berbagai keperluan. Antrakuinon menunjukkan aktivitas biologis *in vitro* yang sangat menarik seperti antimikroba, hipotensi dan antilukemia. Komponen antrakuinon adalah molekul yang secara klinis dianggap penting terutama rubiadin, damnacanthal, alizarin, dan purpurin yang digunakan dalam formula obat kemoterapi (Krishnan, 2016). China merupakan produsen dan eksportir terbesar antrakuinon dalam skala industri (Krishnan, 2016).

Penerapan terapeutik antrakuinon yaitu digunakan sebagai antibakteri, antivirus, anti jamur, anti-helmin, analgesik, hipotensi, anti-inflamasi, anti

genotoksik, anti kanker, antitumor dan agen peningkat kekebalan (Siddiqui, dkk., 2006). Terlepas dari penggunaan di atas, antrakuinon juga digunakan sebagai bahan pewarna yang baik untuk kain sejak zaman kuno dan merupakan kelompok pewarna alami terbesar kedua yang digunakan di industri tekstil.

Metabolit sekunder seperti antrakuinon dapat diperoleh dengan cara mengekstraksi langsung dari organ tanaman, tetapi selain proses ekstraksi dan isolasinya mahal, metode ini membutuhkan budidaya tanaman dalam skala besar dewasa (Purwianingsih & Hamdiyati, 2007). Selain itu penggunaan tanaman dalam produksi senyawa yang diinginkan secara terus menerus dapat berpengaruh pada ketersediaan spesies tanaman tersebut, sedangkan metabolit sintetik juga mahal karena struktur aktif yang sangat kompleks (Balandrin & Klocke, 1988). Oleh karena itu, perlu dilakukan pengembangan metode alternatif dalam ekstraksi tanaman untuk produksi senyawa bioaktif (Chattopadhyay, dkk., 2002).

Perkembangan metabolit sekunder dalam industri komersial beberapa tahun terakhir menimbulkan minat yang lebih besar bagi para peneliti untuk mempelajarinya. Berbagai strategi pun telah dipelajari secara ekstensif oleh para peneliti dalam meningkatkan metabolit sekunder tanaman terutama kemungkinan untuk mengubah produksinya dengan menggunakan teknik kultur jaringan. Kultur jaringan tanaman memiliki potensi dalam produksi skala industri metabolit bioaktif tanaman, seperti untuk memproduksi senyawa obat yang diinginkan dari tanaman.

Kultur jaringan mempunyai beberapa keuntungan yaitu dapat dilakukan produksi senyawa alami secara kontinyu dan reliabel (Vanisree, dkk., 2004), 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 pigmen (Ariningsih, dkk., 2003 ; Purwianingsih & Hamdiyati, 2007). Kontrol otomatis terhadap pertumbuhan sel serta regulasi rasional proses metabolit seperti diatas dapat mengurangi biaya, tenaga kerja, sehingga dapat meningkatkan produktivitas zat organik yang dihasilkan melalui kultur jaringan.

Kultur jaringan tumbuhan yang sering digunakan dalam produksi metabolit sekunder adalah kultur kalus dan kultur suspensi sel Staba (dalam Anggraeni, dkk., 2007). Penemuan kultur sel atau kultur kalus mampu menghasilkan senyawa

metabolit sekunder pada tingkat yang sama atau lebih tinggi dari tanaman utuh. Hal itu sesuai yang dikemukakan oleh Aijaz (2011) bahwa produksi kalus dapat digunakan secara langsung untuk meregenerasi planlet, mengekstrak atau untuk memanipulasi beberapa metabolit primer dan metabolit sekunder. Kultur kalus dan kultur sel tumbuhan secara *in vitro* dapat digunakan sebagai sumber yang potensial untuk produksi metabolit sekunder (Supe, 2013).

Teknik kultur sel atau kultur kalus dapat digunakan sebagai alternatif untuk memproduksi metabolit sekunder termasuk antrakuinon. Beberapa penelitian terkait produksi antrakuinon dari kultur kalus telah dilaporkan, Mischenko, dkk. (1999) berhasil mengisolasi antrakuinon dari kalus yang berasal dari eksplan batang, apeks batang, daun, dan petiolus daun *Rubia cordifolia*, Sepehr & M. Ghorbanli (2000), telah meneliti faktor nutrisi yang memengaruhi produksi antrakuinon pada kultur kalus *Rheum ribes* (L.), Purwianingsih & Hamidiati (2007) telah berhasil mengisolasi kuinon dari kalus *Morinda citrifolia* (L.), Supe (2013) telah menganalisis antrakuinon dari kalus *Aloe barbadensis*.

Produksi metabolit sekunder yang diperoleh melalui kultur jaringan masih rendah, karena itu beberapa teknik diadopsi untuk meningkatkan produksi metabolit sekunder seperti elisitasi, penambahan prazat, transformasi genetik, rekayasa metabolit, dan lain lain (Hahn, dkk., 2005). Elisitasi dipandang sebagai strategi yang efektif untuk meningkatkan produksi senyawa bioaktif penting secara komersial.

Elisitasi adalah suatu metode untuk meningkatkan fitoaleksin dan metabolit sekunder lainnya dengan menambahkan berbagai elisitor, baik berupa faktor abiotik maupun biotik (Buitelaar dkk., 1991). Elisitor adalah zat yang dapat menyebabkan perubahan fisiologis pada tanaman. Tanaman merespon elisitor dengan mengaktifkan berbagai mekanisme serupa dengan respon pertahanan terhadap infeksi patogen atau rangsangan dari lingkungan yang memengaruhi metabolisme tanaman dan meningkatkan sintesis fitokimia. Elisitor abiotik dapat berasal dari bahan kimia anorganik seperti garam atau ion logam. Elisitor biotik berasal dari makhluk hidup seperti jamur, bakteri, virus, infeksi herbivora (elisitor eksogen), dan juga dapat berasal dari elisitor endogen (dilepaskan dari tanaman yang diserang oleh patogen). Elisitor biotik di antaranya, lipopolisakarida, oligosakarida,

polisakarida (pektin dan selulosa dari dinding sel, kitin, kitosan, dan glukana) dan lain-lain (Baenas, 2014).

Kitin adalah polimer alami (biopolimer) terbesar kedua yang terdapat di alam setelah selulosa. Kitin ditemukan dapat bersumber dari berbagai organisme, seperti dari jaringan hewan yang kaya protein termasuk eksoskeleton arthropoda (serangga, crustacea dan arachnida). Berbagai mikroba juga memproduksi kitin pada dinding sel, selaput dan spora, termasuk jamur. Sebagian besar kitin yang diproduksi untuk keperluan agronomi bersumber dari eksoskeleton crustacea yang dikonsumsi manusia terutama udang, kepiting, dan lobster. Selain memiliki kandungan kitin tinggi, penggunaan eksoskeleton crustacea merupakan bentuk pemanfaatan sumber utama limbah dalam industri peternakan udang. Organisasi Pangan dan Pertanian Perserikatan Bangsa-Bangsa memperkirakan bahwa pada tahun 2011 produksi crustacea global mencapai 5,9 ton, dengan 35% - 45% dari jumlah ini menjadi limbah (kepala dan toraks). Hal ini menunjukkan bahwa produksi limbah kitin global dari crustacea ini mencapai 2,1 - 2,7 ton (Sharp, 2013). Kitosan adalah salah satu senyawa turunan dari kitin. Kitosan dapat dihasilkan dari kitin dengan cara deasetilasi. Kitosan telah ditemukan dapat menginduksi berbagai respon pertahanan tanaman (Agrawal, dkk., 2002). Elisitor biotik pertama dijelaskan pada awal tahun 1970an, sejak itu banyak publikasi telah mengumpulkan bukti senyawa yang diturunkan dari patogen yang menginduksi respon pertahanan pada tanaman utuh atau kultur sel tanaman (Baenas, 2014). Beberapa penelitian melaporkan bahwa kitosan dapat digunakan sebagai elisitor untuk peningkatan senyawa antrakuinon. Selain mendapatkan elisitor yang diinginkan, pemanfaatan kitosan sebagai elisitor juga bisa sebagai upaya pemanfaatan limbah, karena apabila limbah udang ini tidak dikelola dengan baik, maka dapat mempengaruhi keseimbangan lingkungan, terutama masalah bau yang dikeluarkan serta estetika lingkungan yang kurang bagus (Swastawati, dkk., 2008).

Baque, dkk. (2012) menganalisis pengaruh elisitor kitosan dan pektin dengan berbagai kombinasi dalam mengakumulasi antrakuinon pada kultur suspensi sel akar adventif dari *Morinda citrifolia* (L.). Kadar optimum elisitor terjadi pada kadar 0,2 mg/mL kitosan dengan diperoleh 103.16 mg/g DW antrakuinon atau meningkat sebesar 45% dibandingkan dengan kultur tanpa elisitor. Jin, dkk. (1999)

menganalisis pengaruh elisor kitosan terhadap produksi antrakuinon pada kultur sel *Rubia akane*. Konsentrasi optimum kitosan terjadi pada 25 mg/L, pada konsentrasi tersebut produksi antrakuinon meningkat dua kali lipat dalam waktu tujuh hari kultur dibandingkan dengan kultur tanpa elisor.

Belum ada penelitian yang menganalisis pengaruh elisor kitosan terhadap kandungan antrakuinon pada kalus yang berasal dari batang muda *Morinda citrifolia* dewasa. Namun pada penelitian sebelumnya Nursolihat (2016) telah melaporkan bahwa berdasarkan hasil ekstraksi pada kalus yang berasal dari batang muda *Morinda citrifolia* dewasa terkandung senyawa kimia antrakuinon. Berdasarkan pemaparan latar belakang di atas, penelitian ini bertujuan meningkatkan kandungan bioaktif golongan antrakuinon pada kultur kalus batang *Morinda citrifolia* dengan metode elisitasi menggunakan kitosan.

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan pemaparan latar belakang di atas, maka dapat dirumuskan rumusan masalah sebagai berikut: “Bagaimana peningkatan kandungan antrakuinon pada kultur kalus dari eksplan batang *Morinda citrifolia* setelah dielisitasi dengan menggunakan kitosan dari kulit udang?”

C. Pertanyaan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah tersebut dapat dibuat menjadi beberapa pertanyaan penelitian yaitu :

1. Bagaimana respons pertumbuhan kalus batang *Morinda citrifolia* pada medium induksi MS dengan penambahan zat pengatur tumbuh 1,75 ppm 2,4-D dan 1,5 ppm kinetin?
2. Apakah penggunaan elisor kitosan dalam berbagai konsentrasi mampu meningkatkan senyawa antrakuinon pada kultur kalus *Morinda citrifolia* ?
3. Berapa lama waktu elisitasi kalus optimal yang dapat meningkatkan kandungan senyawa antrakuinon pada kultur kalus *Morinda citrifolia* ?
4. Bagaimana interaksi konsentrasi kitosan dan lama waktu elisitasi dalam meningkatkan kandungan antrakuinon ?

D. Batasan Masalah

Adapun batasan masalah dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Sumber potongan jaringan untuk induksi kalus adalah batang muda tanaman *Morinda citrifolia* dewasa yang berasal dari samping FPTK UPI.
2. Medium kultur yang digunakan adalah medium Murashige & Skoog (MS) padat dengan penambahan zpt 2,4 D sebesar 1,75 mg/L dan kinetin sebesar 1.5 mg/L (Nursolihat, 2016).
3. Kalus yang akan dielisisasi adalah kalus hasil subkultur kedua, yang telah diketahui kurva tumbuh dari penelitian sebelumnya dalam menentukan waktu terbaik untuk elisitasi yaitu pada hari ke-20 setelah subkultur (Purwianingsih & Hamdiyati, 2007).
4. Elisitor yang digunakan adalah kitosan hasil ekstraksi limbah kulit udang Windu (*Penaeus monodon*) yang diperoleh dari restoran Bali Seafood Bandung.
5. Metode ekstraksi kulit udang menggunakan metode yang sesuai yang telah dilakukan (Alfiah, 2013).
6. Konsentrasi elisitor yang digunakan adalah 0; 0,25; 0,5; 0,75 dan 1 mg ml⁻¹ (Modifikasi Baque, dkk., 2012)
7. Lama waktu elisitasi yang digunakan adalah 0; 2; 4; dan 6 hari (Sitinjak, 2000).
8. Ekstraksi antrakuinon dari kalus *M. citrifolia* (L.) berdasarkan modifikasi metode (Hagendoorn, dkk., 1994).
9. Analisis kandungan antrakuinon diukur menggunakan spektrofotometer (Hagendoorn, dkk., 1994).

E. Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian ini adalah untuk menganalisis peningkatan kandungan antrakuinon pada kultur kalus batang *Morinda citrifolia* setelah dielisisasi dengan menggunakan kitosan dari kulit udang.

F. Manfaat Penelitian

Adapun manfaat dari penelitian ini adalah sebagai berikut.

- a. Manfaat teoritis

- a. Memberikan informasi terkait kandungan antrakuinon kultur kalus *Morinda citrifolia* (L.) setelah dielisitasi dengan kitosan.
- b. Memberikan informasi terkait konsentrasi kitosan dan lama waktu elisitasi yang optimum untuk menghasilkan kandungan antrakuinon pada kultur kalus *Morinda citrifolia* L.
- b. Manfaat praktis
 - a. Pemanfaatan limbah kulit udang menjadi senyawa kitosan yang bermanfaat salah satunya sebagai elisitor.
 - b. Produksi antrakuinon dapat dilanjutkan untuk skala produksi lebih besar untuk bahan pembuatan obat-obatan.

G. Asumsi

1. 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* (Korulkin & Muzychkina, 2014).
2. Senyawa antrakuinon ditemukan paling banyak pada genus *Morinda* (Phakhode, 2012)
3. Batang *Morinda citrifolia* mengandung senyawa antrakuinon (Siddiqui, 2006 ; Nursolihat, 2016).
4. Sifat totipotensi sel memungkinkan setiap sel untuk memproduksi setiap zat yang dihasilkan oleh induknya (Vasil & Vasil, 1972). Jadi, sel dari jaringan batang *Morinda citrifolia* memungkinkan untuk memproduksi senyawa antrakuinon.
5. Kitosan memberikan efek peningkatan terhadap produksi metabolit sekunder senyawa antrakuinon pada kultur suspensi akar *Morinda citrifolia* (Baque, dkk., 2012).

H. Hipotesis Penelitian

1. Produksi antrakuinon pada kultur kalus batang *Morinda citrifolia* akan meningkat setelah dielisitasi dengan kitosan.

2. Pada konsentrasi elisitor dan lama elisitasi yang optimum, kultur kalus batang *Morinda citrifolia* dapat menghasilkan senyawa antrakuinon dengan konsentrasi paling tinggi.

I. Struktur Organisasi

Bab I memuat alasan metabolit sekunder dijadikan sebagai bahan obat, serta sumber penghasil metabolit sekunder. Selain itu memuat alasan-alasan penulis memilih tanaman *Morinda citrifolia* sebagai sumber senyawa bioaktif dilengkapi dengan manfaat dan kandungannya. Bab 1 juga memuat alasan penulis memilih senyawa antrakuinon sebagai salah satu senyawa yang terdapat pada mengkudu yang dikembangkan dengan menggunakan metode kultur jaringan untuk ditingkatkan produksinya. Serta memuat tentang kelebihan metode kultur jaringan, cara-cara yang dapat dikembangkan dari metode ini. Bab ini juga memuat alasan penulis memilih kulit udang sebagai bahan untuk elisitor.

Bab II memuat mengenai teori-teori pendukung yang relevan dari setiap poin penting sub judul penelitian. Bab ini memuat penjelasan mengenai *Morinda citrifolia*, kultur jaringan, kalus, senyawa antrakuinon, senyawa metabolit sekunder, elisitasi, dan penjelasan tentang kitosan

Bab III memuat tentang metode penelitian atau langkah-langkah yang dilakukan dalam penelitian dari mulai tahap persiapan sampai tahap analisisnya. Secara ringkas tahapannya terdiri persiapan alat dan bahan, persiapan pembuatan larutan stok, pembuatan media, sterilisasi alat dan medium, sterilisasi *laminar air flow*, inisiasi kalus, persiapan bahan elisitor, pelarutan kitosan, elisitasi, ekstraksi serta analisis kandungan metabolit sekunder.

Bab IV memuat tentang temuan dari penelitian serta pembahasan mengenai hasil temuan penelitian tersebut. Secara garis besar, temuan dalam penelitian ini adalah mengenai respon pertumbuhan eksplan batang *M. citrifolia* (L.), dan peningkatan kandungan antrakuinon berdasarkan: interaksi konsentrasi elisitor kitosan serta lama waktu elisitasi, perbedaan konsentrasi kitosan, dan lama waktu elisitasi.

Bab V memuat tentang simpulan, implikasi dan rekomendasi yang ditemukan berdasarkan hasil temuan dan pembahasan penelitian. Simpulan berisi tentang konsentrasi elisitor kitosan dan waktu panen yang memberikan respon paling baik

terhadap produksi senyawa antrakuinon dari kalus mengkudu. 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.