

## MENINGKATKAN PRODUKSI FLAVAN-3-OL MELALUI KALUS *Camellia sinensis* L. DENGAN ELISATOR $Cu^{2+}$

Sutini B<sup>1</sup>, Tatik W<sup>2</sup>, Wahyu W<sup>3</sup>, Sutiman B. Sumitro<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Agronomy Department of Agriculture Faculty UPN 'Veteran', Surabaya-East Java

<sup>2</sup>Agronomy Department of Agriculture Faculty, Brawijaya University, Malang-East Java

<sup>3</sup>Biology Department of FMIPA, Brawijaya University, Malang-East Java

E-mail: tien\_basuki@yahoo.com

### ABSTRACT

*Flavan-3-ol is a secondary metabolite in tea plant that is used as anti obesity agent. The difficulty in obtaining Flavan-3-ol out of tea plant is due to dependency on season, need for large land, need for very intensive care and relatively low production. There fore flavan 3-ol production needs to be developed in vitro culture technique. This technique can cope with the handicapes above. It can effectively control production and requires less space. The purpose of this research was to enhance flavan 3-ol production by modifying medium and precursor appropriately. The steps of this process were: (1) Callus induction through cultivating the tea shoot explants on medium filled with some growth hormone, (2) flavan-3-ol induction on callus culture using  $Cu^{2+}$  elicitor (3) Observation over callus growth, (4) Observation over qualitative characterizes of flavan 3-ol. The result of the research using  $Cu^{2+}$  elicitor shows that the production of flavan-3-ol increases by 12.5%.*

**Key words:** *flavan 3 ol, Callus culture, Camellia sinensis L, Ion  $Cu^{2+}$  elicitor*

### PENGANTAR

*Flavan-3-ol* adalah metabolit sekunder yang terdapat dalam daun teh muda (Peter, 2002). Sebagai bahan bioaktif memiliki khasiat antiobesitas. Senyawa *flavan-3-ol* ini berperan sebagai zat untuk menghancurkan lemak (Rahardjo dan Hermani, 2005), juga antioksidan yang memberikan efek penetralisasi kuat terhadap senyawa radikal bebas endogen dan eksogen (Murphy, 1999). Radikal bebas tersebut menyerang sistem intraseluler dalam berbagai jaringan tubuh. Itulah yang menyebabkan munculnya tumor, kanker, dan berbagai penyakit degeneratif lainnya. Menurut (Karlina, 2006) *flavan-3-ol* adalah antioksidan yang kekuatannya 100 kali lebih efektif dibandingkan vitamin C dan 25 kali lebih dibandingkan vitamin E.

Kendala ketersediaan tanaman yang dipengaruhi musim, dengan curah hujan (1075–5450 mm tahun<sup>-1</sup>), suhu 24,4° C (Williges, 2004), kadar senyawa yang relatif rendah sekitar 1–3% (Ruan, 2005) memerlukan lahan luas, memerlukan pemeliharaan intensif seperti penyiangan, pemangkasan, pemberantasan gulma, pemberantasan hama-penyakit (Setiti, 2000). Oleh karena itu, produksi metabolit sekunder *flavan-3-ol* perlu dikembangkan dengan teknik kultur *in-vitro*.

Teknik ini mempunyai keuntungan dalam produksi metabolit dibandingkan dengan tanaman utuh karena kecepatan pertumbuhan sel dan biosintesis dalam kultur yang diinisiasi dari eksplan sangat tinggi dan dalam periode

yang sangat singkat. Beberapa keuntungan dari pemakaian teknik kultur *in-vitro* untuk produksi metabolit sekunder antara lain: tidak tergantung musim, sistem produksi dapat diatur sesuai kebutuhan, lebih konsisten, dan mengurangi penggunaan lahan (Watimena, 1992). Kultur *in-vitro* juga lebih ekonomis untuk tanaman yang memerlukan waktu lama untuk mencapai usia produktif.

Akumulasi metabolit sekunder dalam kultur *in-vitro* dapat ditingkatkan melalui berbagai cara, di antaranya dengan: perlukaan (Mondal dkk., 2004), radiasi, sinar, diberi patogen misal jamur, pertumbuhan diganggu lewat pengurangan nutrisi, penambahan toksin logam berat/elisitor. Peran elisitor dan  $Cu^{2+}$  dalam sintesis metabolit sekunder dapat menginduksi asam askorbat dan *Flavan-3-ol* lewat stimulasi (Saptarini, 1994). Penggunaan ion logam  $Cu^{2+}$  diperlukan karena berperan dalam proses enzimatis seperti *cytochrom oxidase*, *ascorbic acid oxidase* dan *laccase* dan reaksi oksidasi-reduksi.

Penelitian ini bertujuan untuk meningkatkan produksi *flavan-3-ol* dengan teknik kultur *in-vitro* melalui pemberian elisitor  $Cu^{2+}$  sebagai upaya untuk mendapatkan bahan bioaktif dalam skala besar.

### BAHAN DAN CARA KERJA

Bahan penelitian adalah eksplan pucuk daun teh dari tanaman berumur 4 tahun, menggunakan medium MS pada pH 5,8 dengan penambahan gula 3%, agar 0,8%, 2,4-D 1

ppm, kinetin 1 ppm, dan elisitor ion logam  $\text{Cu}^{2+}$  1, 5, dan 10 ppm dimasukkan dalam botol kultur  $\pm$  25 ml. Setiap perlakuan diulang sebanyak 3 kali. Sterilisasi alat-alat dan media kultur pada autoklaf suhu  $121^\circ\text{C}$  selama 9 menit dan tekanan 1 atm. Kegiatan kultur dilakukan di *laminar air flow*.

Induksi kalus dengan eksplan pucuk daun teh dilakukan pada medium MS yang mengandung hormon 2,4-D dan kinetin masing-masing 1 ppm (Franco *et al.*, 2006). Eksplan dipetik dari pucuk daun teh pada posisi 1, 2 dan 3 (Simanjuntak, 2004) dicuci dengan air yang mengalir selama sepuluh menit. Untuk sterilisasi, eksplan direndam sambil dikocok pelan dalam larutan 5,25% natrium hipoklorit selama 30 menit. Dibilas dengan akuades steril, sambil dikocok pelan selama 5 menit. Pembilasan diulangi 3 kali. Dipindahkan pada cawan Petri, untuk menghilangkan tulang dan tepi daun, kemudian dipotong-potong ukuran 0,5–1 cm. Potongan ditanam sebanyak 4–5 eksplan dalam botol kultur lalu diinkubasi di ruang bersuhu  $25^\circ\text{C}$ . Kalus yang terbentuk disubkultur untuk memperbanyak jumlah kalus.

Kalus dipotong menjadi 4–5 bagian dan dipindahkan pada media baru secara aseptis, diinkubasi dalam ruang, bersuhu  $25^\circ\text{C}$  selama 4 minggu dengan pencahayaan 1100 lux. Kalus dipilih yang berwarna putih kehijauan. Kalus hasil subkultur pertama digunakan sebagai eksplan untuk elisitasi.

Kalus hasil subkultur sebanyak 0,500 gram dipindah ke media baru yang mengandung elisitor ion logam  $\text{Cu}^{2+}$  dengan variasi konsentrasi 1, 5, 10 ppm.

Analisis kalus *flavan-3-ol* dilakukan pada umur 4 minggu dari sejak dipindah ke medium elisitasi dengan cara mengeluarkannya dari botol. Sebelum analisis kandungan *flavan-3-ol*, kalus ditiriskan, sebagian kecil diamati secara mikroskopis. Sebagian lagi ditimbang untuk mendapatkan bobot basah, kemudian dievaluasi pertumbuhannya dengan parameter indeks pertumbuhan (IP), yaitu perbandingan bobot akhir pada saat panen terhadap bobot awal saat penanaman. Pemeriksaan kualitatif kandungan *flavan-3-ol* dengan melarutkan ekstrak *flavan-3-ol* sebanyak 100 mg ke dalam 1 ml metanol (Caffin dkk., 2004), kemudian ditotolkan pada lempeng kromatografi lapis tipis (KLT).

Pada lempeng yang sama juga ditotolkan standar *flavan-3-ol* sebagai pembanding kemudian dievaluasi dengan fase gerak: kloroform: asam asetat: asam formiat: iso butanol (8:1:1:4). Setelah kering diamati spektrum serapan secara KLT-densitometri pada panjang gelombang 254–366 nm.

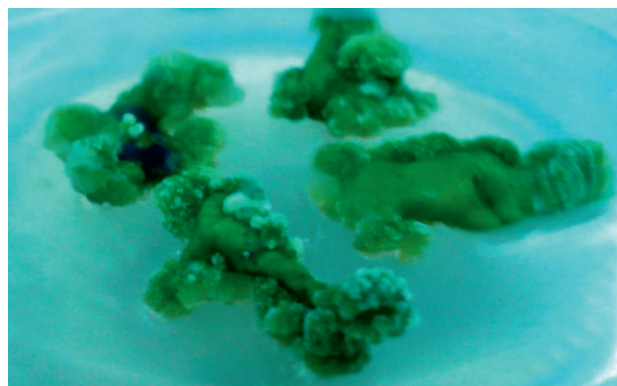
Untuk mengetahui pengaruh perlakuan elisitasi ion logam  $\text{Cu}^{2+}$  dilakukan uji Anava apabila perlu dilanjutkan uji BNT.

Untuk mengetahui peningkatan konsentrasi *flavan-3-ol*, diperoleh dengan menyuntikkan ekstrak sampel kalus pada kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) dengan kondisi terpilih. Area yang didapat diinterpolasi ke dalam kurva standar dan kurva sampel tanpa perlakuan/kontrol, kemudian dilakukan perhitungan peningkatan konsentrasi *flavan-3-ol* pada kalus.

## HASIL

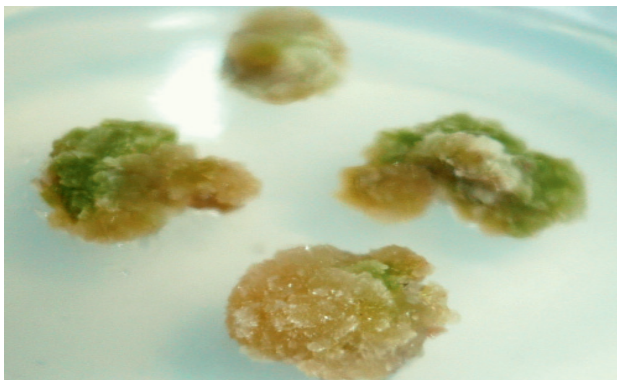
### Induksi Kalus Teh

Empat minggu setelah induksi, kalus terbentuk pada tepi jaringan yang terpotong kemudian melebar ke seluruh permukaan eksplan. Hasil induksi kalus dari daun teh dengan media MS ditambah 2,4-D 1 ppm dan kinetin 1 ppm dapat dilihat pada Gambar 1.



**Gambar 1.** Induksi daun teh umur 4 minggu, dengan media MS + 2,4-D 1 ppm dan kinetin 1 ppm

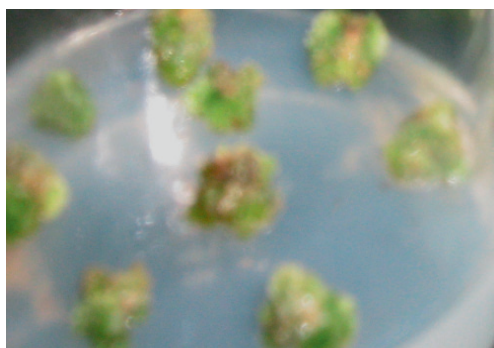
Pada hasil subkultur pertama, pada umur empat minggu setelah masa tanam, diameter kalus meningkat menjadi  $\pm$  1 cm (Gambar 2).



**Gambar 2.** Kalus subkalus, umur 4 minggu

### Morfologi Kalus

Morfologi kalus pada media kontrol dan media dengan penambahan elisitor  $\text{Cu}^{2+}$  menunjukkan bentuk dan warna hampir sama yaitu hijau kekuningan (Gambar 3).



A. Kontrol



B. Perlakuan

**Gambar 3.** Morfologi kalus menunjukkan pertumbuhan dan warna hampir sama antara kontrol dan perlakuan (penambahan elisitor  $\text{Cu}^{2+}$ )

### Pengamatan Morfologis

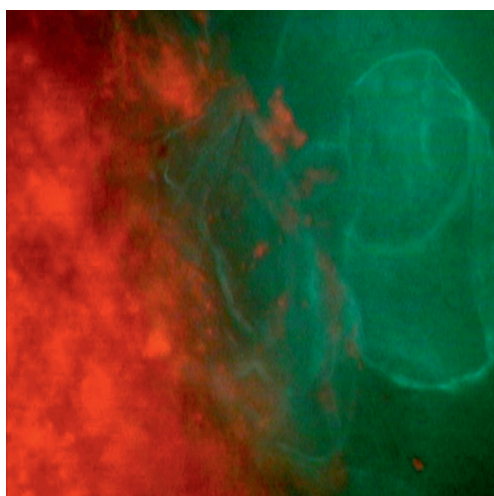
Pengamatan morfologis dengan mikroskop fluoresen perbesaran  $400\times$  menunjukkan perbedaan. Bentuk sel kultur perlakuan elisitor lebih berisi dibandingkan dengan sel kultur tanpa perlakuan elisitor (Gambar 4).

### Uji KLT- Densitometer *Flavan-3-ol*

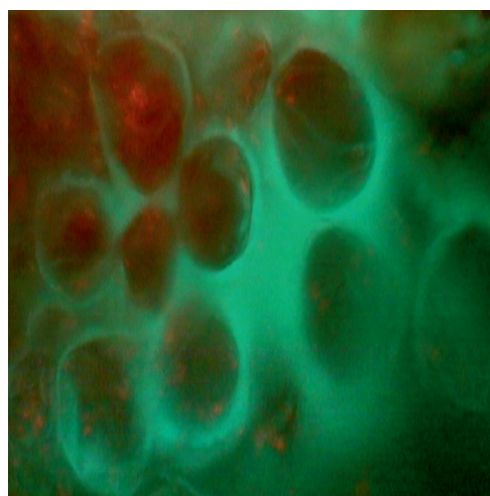
Hasil penotolan, diamati pada KLT- Densitometri (Markham, 1988) pada sinar UV panjang gelombang ( $\lambda$ ) 254–366 nm. Spektrum serapan sampel yang dihasilkan sama dengan spektrum serapan standar *flavan-3-ol* (Gambar 5A–B).

### Pengaruh Elisitasi

Elisitasi sangat efektif untuk merangsang pembentukan metabolit *flavan-3-ol*, namun dalam penelitian ini tidak memengaruhi pertumbuhan kalus.

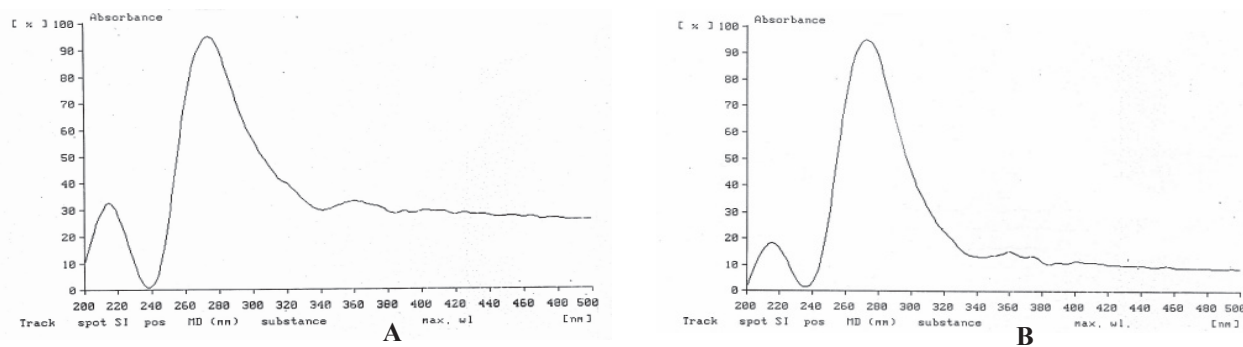


A. Sel kultur tanpa elisitor-elisitor



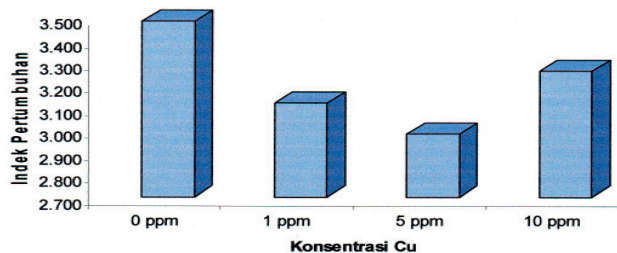
B. Sel kultur dengan perlakuan elisitor

**Gambar 4.** Pengamatan morfologis dengan mikroskop fluoresen pembesaran  $400\times$ : (A) Sel kultur tanpa elisitor (B) Sel kultur dengan perlakuan elisitor



Gambar 5. Spektrum serapan diamati pada KLT-densitometri: (A) spektrum serapan standar, (B) spektrum serapan kultur teh elisitor

Kultur teh hasil pemanenan tiga kali ulangan, kultur kalus ditimbang. Berat basah dievaluasi pertumbuhannya dengan parameter indeks pertumbuhan (IP), hasil perhitungan dan histogram IP dapat dilihat pada Tabel 1 dan Gambar 6.



Gambar 6. Indeks pertumbuhan kultur kalus dengan elisitor

**Perhitungan Produk *Flavan-3-ol* Hasil Elisitasi**

Hasil perhitungan konsentrasi kontrol didapat dari interpolasi ke dalam kurva regresi kontrol ditambah lima macam konsentrasi *flavan-3-ol* ( $\mu\text{g/ml}$ ) VS Area ( $\text{mAU} \cdot \text{s}$ ), didapat persamaan sebagai;  $y = 20,11161 \times + 9,25102$ .

Bila y dipotongkan pada x, didapat

$$x = \frac{9,25102}{20,11161}$$

$x = 0,45998 \mu\text{g/ml}$  (konsentrasi *flavan-3-ol* pada kontrol)

Hasil perhitungan konsentrasi *flavan-3-ol* ditambah elisitasi  $\text{CuSO}_4$  5 ppm dengan adisi standar  $15 \mu\text{g/ml}$  didapat area = 344,47. Area ini diinterpolasi ke dalam kurva-kurva standar regresi linier sebagai;

$$Y = 19,2792 \times - 15,334.$$

$$344,47 = 19,2792 \times - 15,334.$$

$$X = \frac{344,47 + 15,334}{19,2792}$$

$$X = 18,662 \mu\text{g/ml} \text{ (perlakuan elisitasi + standar).}$$

Konsentrasi *flavan-3-ol* perlakuan elisitasi =

$$18,662 \mu\text{g/ml} - 15 \mu\text{g/ml} = 3,66280 \mu\text{g/ml}.$$

Peningkatan produk *flavan-3-ol* hasil perlakuan

$$\text{elisitasi adalah: } \frac{0,45998}{3,6628} \times 100\% = 12,55\%$$

**PEMBAHASAN**

Kalus elisitasi berwarna hijau. Seiring dengan pertumbuhan, warna menjadi hijau kekuningan/keputihan pada permukaan yang dilukai, karena respons terhadap kerusakan, sesuai dengan penelitian Evans dkk. (2003) ketika tanaman dilukai, akan terjadi penebalan luka yang disebut kalus.

Elisitasi perlu optimasi: konsentrasi, waktu elisitasi, dan dosis. Penambahan  $\text{Cu}^{2+}$  dalam kultur *in-vitro* sampai dosis tertentu dapat memengaruhi akumulasi metabolit sekunder, hal ini disebabkan karena ion logam  $\text{Cu}^{2+}$  dapat berfungsi sebagai pemacu terhadap aktivitas lipoxigenase, membran sel dan  $\text{Ca}^{2+}$  dalam sitosol sehingga berpengaruh pada metabolisme, hasil metabolit dan pertumbuhan sel. Relevan dengan penelitian Hernandez dkk. (2005) bahwa penggunaan elisitor  $\text{CuSO}_4$  pada kultur tanaman *Grindelia pulchella* dapat meningkatkan bobot kalus sampai 3,5 kali.

Tabel 1. Indeks pertumbuhan kultur kalus dengan elisitor Cu

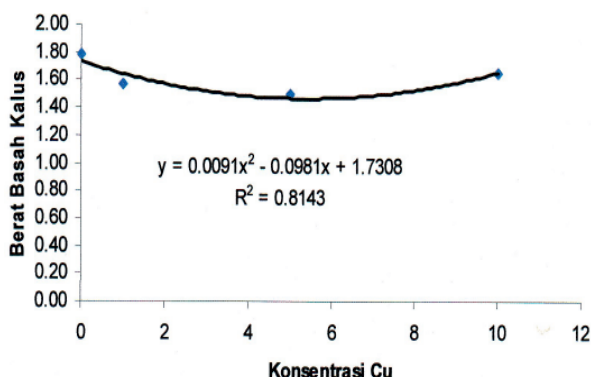
Konsentrasi Cu	$\bar{x}$ Bobot awal (g)	SD	$\bar{x}$ Bobot akhir (g)	SD	IP	SD
0 ppm	0,512	0,00990	1,783	0,06576	3,481	0,06114
1 ppm	0,503	0,00424	1,570	0,01414	3,121	0,00179
5 ppm	0,501	0,00919	1,493	0,14284	2,981	0,23064
10 ppm	0,506	0,00849	1,651	0,13152	3,261	0,20524

Pengamatan morfologis dengan mikroskop fluoresen terlihat bahwa perlakuan ion logam  $\text{Cu}^{2+}$  menunjukkan penambahan isi sel dibanding sel kultur tanpa perlakuan elisitor, penambahan isi sel ini diduga sebagai plastida, hal ini sesuai pendapat (Salisbury dkk., 1996) bahwa ion  $\text{Cu}^{2+}$  pada tanaman terdapat pada protein kloroplas.

Pertumbuhan kalus lambat karena kalus menyesuaikan diri dengan media baru dan kalus masih berada pada fase lag menuju fase linier pertumbuhan sel, pada fase linier pembentukan metabolit sekunder mulai terjadi.

Berdasarkan uji Anava perlakuan pada konsentrasi 5 ppm mempunyai perbedaan pengaruh yang sama (tidak signifikan) dengan perlakuan 1 ppm. Namun perlakuan pada konsentrasi 5 ppm memberikan perbedaan pengaruh yang signifikan terhadap konsentrasi 10 ppm dan 0 ppm. Hal ini relevan dengan penelitian Kusumaeni (2000) bahwa penambahan  $\text{Cu}^{2+}$  sebesar 2,5 ppm meningkatkan metabolit sekunder.

Analisis Regresi  $Y = 0,0091 X^2 - 0,0981 X + 1,7308$  yang memiliki kontribusi sebesar 0,8143 (Gambar 7), hal ini berarti bahwa kenaikan konsentrasi  $\text{Cu}^{2+}$  akan memberikan pengaruh terhadap bobot basah kalus sebesar 81,43%.



**Gambar 7.** Hubungan berat basah kalus dengan konsentrasi  $\text{Cu}^{2+}$

Peningkatan produk kalus *flavan-3-ol* sebesar 12,5% dibandingkan kalus tanpa perlakuan adalah karena penggunaan konsentrasi ion logam  $\text{Cu}^{2+}$  sebanyak 5 ppm, yang merupakan konsentrasi kritis yang dapat memberikan pengaruh maksimum pada produk kultur *flavan-3-ol*.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada DP2M Ditjen Dikti Depdiknas yang telah mendanai penelitian ini melalui Hibah Bersaing TH 2006/2007.

## KEPUSTAKAAN

- Caffin N, D'Arcy B, Yao L, Rintou N, 2004. Developing an index of quality for Australian tea. Rural Industries Research and Development Corporation. <http://www.rirdc.gov.au>
- Evans DE, Coleman JOD, dan Kearns A, 2003. Plant Cell Culture, Bio Scientific Publishers, New York.
- Franco ETH, Gavioli B dan Ferreira AG, 2006. In Vitro Regeneration of *Didymopanax morototoni*. *Brazil. J. Biol.*, 66 (2A): 455–462. Diakses 30 Agustus 2006.
- Hernandez, Alejandro A. Orden, Oscar S. Giordano, Marcela Kurina, 2005. Effects of elicitor and copper sulfate on *grindelic acid* production in submerged cultures of *Grindelia pulchella*. *Electronic Journal of Biotechnology*. 8(3). [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S071734582005000300007](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S071734582005000300007)
- Karlina, 2006. Penetapan Kadar Epigallocatechin Gallate (EGCG) dalam Daun Teh dengan Metode KCKT. Skripsi Fakultas Farmasi Unair. Surabaya.
- Kusumaeni Tri, 2000. Pengaruh Kadar Ion Cu terhadap Pertumbuhan dan Kandungan Fitosteroid dari Kultur Kalus *Costus Speciosus (Koen) F8*. Skripsi Fakultas Farmasi Unair, Surabaya.
- Markham, 1988. Cara Mengidentifikasi Flavonoid Alihbahasa Kosasih Padmawinata. Penerbit ITB, Bandung, p. 192.
- Mondal TK, Bhattacharya, Laxmikumaran, Ahuja, 2004. Recent advances of tea (*Camellia sinensis*) biotechnology. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 76: 195–254.
- Murphy CM, 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical* 12(4): 564–82.
- Peter WL, 2002. Biochemical analysis for identification of quality in black tea (*Camellia sinensis*). Disertasi. Faculty of Natural and Agricultural Sciences. Departement of Biochemistry. University of Pretoria. Petroria. South Africa, p. 42. <http://upetd.up.ac.za/thesis/available/etd-03012005084935/unrestricted/00dissertation.pdf>
- Rahardjo dan Hermani, 2005. Tanaman Berkasiat Anti Oksidan. Penebar Swadaya, Jakarta. p. 82.
- Ruan J, 2005. Quality-related constituents in tea (*Camellia sinensis* L) as affected by the form and concentration of nitrogen and the supply of chloride. *Disertasi*. Zur Erlangung des Doktorgrades deragrarunermahrungswissenschaftliche Fakultat der Christian-Albrechts-Universitat zu Kiel, Germany. [http://www.e-diss.uni-kiel.de/diss\\_1343/d1343.pdf](http://www.e-diss.uni-kiel.de/diss_1343/d1343.pdf).
- Salisbury BF dan Ross WC, 1996. Fisiologi Tumbuhan. ITB Bandung. Terjemahan Diah R Lukman dan Sumaryono, p. 148.
- Saptarini N, 1994. Membuat Tanaman Cepat Berbuah. Penebar Swadaya, Jakarta. p. 22.
- Setiti E, 2000. Prospek Aplikasi Teknik Kultur Jaringan dalam Agrobisnis. Prospek Agrobisnis Menyongsong Otonomi Daerah. *Prosiding* Fakultas MIPA Unair Surabaya, p. 1–6.

- Simanjuntak T, 2004. Pemanfaatan Pengetahuan Bioteknologi pada Teh hijau. Cakrawala, Medan.
- Watimena GA, 1992. Bioteknologi Tanaman. Pusat Antar Universitas. IPB Bogor.
- Williges U, 2004. Status of organic agriculture in Sri Lanka with special emphasis on tea production systems (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze). *Disertasi*. Faculty of Plant

Production, Justus-Liebig-University of Giessen. P. 4.  
<http://geb.unigiessen.de/geb/volltexte/2005/2315/pdf/WilligesUte-2005-02-10.pdf>.

*Keterangan:*

*Data yang digunakan adalah sebagian dari data disertasi di Program Studi Ilmu-Ilmu Pertanian Minat Bioteknologi. Program Pascasarjana Universitas Brawijaya Malang.*

Reviewer: **Dr. Diah R. Lukman**