



TUGAS AKHIR - SB141510

**PENGARUH ASAM SALISILAT DAN
FENILALANIN TERHADAP KANDUNGAN
TOTAL ASAM FENOL PADA KULTUR SUSPENSI
SEL *Moringa oleifera* Lam.**

YUNITA PERMANASARI
1511 100 010

Dosen Pembimbing:
Dr. Nurul Jadid, M.Sc
Dr. techn. Endry Nugroho Prasetyo, M.T

JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER
SURABAYA 2015



FINAL PROJECT - SB141510

**THE EFFECT OF SALICYLIC ACID AND
PHENYLALANINE ON THE TOTAL PHENOLIC
ACID CONTENT IN CELL SUSPENSION
CULTURE OF *Moringa oleifera* Lam.**

YUNITA PERMANASARI
1511 100 010

Advisor Lecturer:
Dr. Nurul Jadid, M.Sc
Dr. techn. Endry Nugroho Prasetyo, M.T

BIOLOGY DEPARTEMENT
FACULTY OF MATHEMATICS AND NATURAL SCIENCES
SEPULUH NOPEMBER OF INSTITUTE TECHNOLOGY
SURABAYA 2015

LEMBAR PENGESAHAN

PENGARUH ASAM SALISILAT dan FENILALANIN TERHADAP KANDUNGAN TOTAL ASAM FENOL PADA KULTUR SUSPENSI SEL *Moringa oleifera* Lam.

TUGAS AKHIR

Diajukan Untuk Memenuhi Salah Satu Syarat Memperoleh
Gelar Sarjana Sains
Pada
Jurusan S 1 Biologi
Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam
Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya

Oleh :
YUNITA PERMANASARI
NRP. 1511 100 010

Disetujui oleh Pembimbing Tugas Akhir :

Dr. Nurul Jadid, M.Sc (Pembimbing 1)

Dr. techn. Endry Nugroho Prasetyo, M.T (Pembimbing 2)

Surabaya, 27 Juli 2015

Mengetahui,
Ketua Jurusan Biologi



Drs. mat. Ir. Maya Shovitri, M.Si
NRP. 19690907 199803 2 001

**PENGARUH ASAM SALISILAT dan
FENILALANIN TERHADAP KANDUNGAN
TOTAL ASAM FENOL PADA KULTUR SUSPENSI
SEL *Moringa oleifera* Lam.**

Nama Mahasiswa : Yunita Permanasari
NRP : 1511 100 010
Jurusan : Biologi
Dosen Pembimbing : Dr. Nurul Jadid, M.Sc
Dr. techn. Endry N.P., M.T.

Abstrak

Moringa oleifera merupakan tanaman yang berpotensi tinggi untuk dikembangkan dalam sektor industri seperti industri farmasi karena kandungan senyawa fenolnya yang tinggi. Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui pengaruh asam salisilat sebagai elisitor dan phenilalanin sebagai prekursor terhadap kandungan total asam fenol pada kultur suspensi sel M. oleifera.

Rancangan penelitian yang digunakan adalah RAL (rancangan acak lengkap) dengan ulangan sebanyak 3 kali. Parameter uji yang dilakukan adalah estimasi senyawa total asam fenol menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan berat kering hasil perlakuan asam salisilat dan fenilalanin. Hasil dianalisa menggunakan anova one way dan uji Tukey.

Hasil penelitian menunjukkan variasi konsentrasi asam salisilat dan fenilalanin berpengaruh terhadap peningkatan kandungan total asam fenol pada kultur suspensi sel M. oleifera Total asam fenol tertinggi terdapat pada asam salisilat 1 ppm $1,6067 \pm 0,458$ ppm dan fenilalanin 5 ppm $1,60 \pm 0,37$ ppm.

Kata kunci: asam fenol ,asam salisilat, fenilalanin, M. oleifera

THE EFFECT OF SALICYLIC ACID and PHENYLALANINE ON THE TOTAL PHENOLIC ACID CONTENT IN CELL SUSPENSION CULTURE OF *Moringa oleifera* Lam.

Student Name : Yunita Permanasari
NRP : 1511 100 010
Department : Biology FMIPA ITS
Supervisor : Dr. Nurul Jadid, M.Sc
Dr. techn. Endry N.P., M.T.

Abstract

Moringa oleifera is a plant that has high potential to be developed in industrial sectors such as the pharmaceutical industry because of the high content of phenol compounds. The purpose of this study was to determine the effect of salicylic acid as elicitor and phenylalanine as a precursor to the total content of phenolic acids in cell suspension cultures of *M. oleifera*.

The research design used was RAL (completely randomized design) with 3 replications. Test parameters the estimation of the total phenolic acids compounds using UV-Vis spectrophotometer and the dry weight of salicylic acid and phenylalanine treatment. The result were analyzed by one-way ANOVA and Tukey test.

The results showed that varying concentration of salicylic acid and phenylalanine affect the increase of the total content of phenolic acids in cell suspension cultures of *M. oleifera*. The highest total phenolic acids contained at concentration of salicylic acid 1 ppm was 1.6067 ± 0.458 ppm and phenylalanine 5 ppm was $1,60 \pm 0.37$ ppm

Keywords: phenolic acid, salicylic acid, phenylalanine, *Moringa oleifera*

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, puji syukur dipanjatkan kepada Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan laporan tugas akhir dengan judul Pengaruh Asam Salisilat Dan Fenilalanin Terhadap Kandungan Total Asam Fenol Pada Kultur Suspensi Sel Moringa oleifera Lam. Penyusunan laporan tugas akhir ini merupakan persyaratan untuk menyelesaikan mata kuliah seminar di Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya.

Dalam penyusunan laporan tugas akhir tidak lepas dari bimbingan dan bantuan berbagai pihak. Penulis mengucapkan terima kasih kepada ibu Tutik Nurhidayati, S.Si, M.Si selaku dosen penguji 1, ibu Dr. Enny Zulaika, M.P selaku dosen penguji 2, Bapak Dr. Nurul Jadid, M.Sc selaku dosen pembimbing 1, Bapak Dr. techn. Endry Nugroho Prasetyo, M.T selaku pembimbing 2, dan ibu Dr.rer.nat.Ir. Maya Shovitri, M.Si selaku ketua Jurusan Biologi FMIPA ITS dan kepada bapak Isdiantoni, S.P, M.P serta ibu Maharani Pertiwi Koentjoro, M. Biotech. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada seluruh keluarga termasuk ayah dan ibu, teman – teman seperjuangan, dan seluruh pihak yang telah membantu dalam penyusunan laporan tugas akhir ini.

Penulis menyadari bahwa penulisan laporan ini masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu, kritik dan saran yang membangun sangat berarti bagi penulis dan semoga dapat bermanfaat untuk penulis maupun pembaca.

Surabaya, 27 Juli 2015

Yunita permanasari

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN PENGESAHAN	iii
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vii
KATA PENGANTAR	ix
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Permasalahan	2
1.3 Batasan Masalah	3
1.4 Tujuan	3
1.5 Manfaat	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 <i>M. oleifera</i> Lam.....	5
2.1.1 Klasifikasi.....	5
2.1.2 Morfologi	7
2.1.3 Habitat dan penyebaran	7
2.2 Kandungan metabolit sekunder <i>M. oleifera</i> Lam	9
2.3 Senyawa fenol	9
2.3.1 Asam fenol	10
2.4 Elisitor	11
2.5 Prekursor feeding	14
2.6 Kultur suspensi sel.....	15
2.7 Metode ekstraksi.....	18
BAB III METODOLOGI	
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	21
3.2 Metode yang Digunakan	21
3.2.1 Pembuatan larutan stok ZPT	21

3.2.1.1 Stok 2,4 D.....	21
3.2.1.2 Stok BAP.....	21
3.2.2 Pembuatan stok phenilalanin dan asam salisilat.....	22
3.2.2.1 Stok phenilalanin.....	22
3.2.2.2 Stok asam salisilat	22
3.2.3 Pembuatan medium induksi kalus	22
3.2.4 Sterilisasi	23
3.2.5 Inokulasi eksplan.....	24
3.2.6 Perlakuan dengan elisitor dan prekursor feeding ...	24
3.2.6.1 Inokulasi eksplan.....	24
3.2.6.2 Proses pemanenan kultur suspensi sel.....	24
3.2.7 Estimasi total asam fenol.....	25
3.2.7.1 Ekstraksi asam fenol.....	25
3.2.7.2 Kuantifikasi asam fenol menggunakan spektrofotometer UV-Vis	25
3.2.8 Penghitungan berat kering.....	25
3.3 Rancangan Penelitian dan Analisis Data	26
3.3.1 Rancangan penelitian	26
3.3.2 Analisis data	26
 BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Hasil induksi kalus eksplan biji tanaman kelor (<i>M. oleifera</i>)	29
4.2 Uji kualitatif keberadaan senyawa asam fenol	30
4.3Pengaruh elisitor asam salisilat pada kultur suspensi sel <i>M. Oleifera</i>	32
4.4 pengaruh prekursor feeding fenilalanin pada kultur suspensi sel <i>M. oleifera</i>	34
 BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1 Kesimpulan.....	37
5.2 Saran	37
DAFTAR PUSTAKA	39
LAMPIRAN	49

DAFTAR TABEL

		Halaman
Tabel 2.1	Kandungan Fenol Dan Flavonoid Pada Ekstrak Daun <i>M. oleifera</i> Lam. Dengan Umur Yang Berbeda.....	8
Tabel 2.2	Kandungan Fenol Dan Flavonoid Pada Ekstrak Daun <i>M. oleifera</i> Lam. Dengan <i>Solvent</i> Yang Berbeda.....	9
Tabel 3.1	Rancangan Percobaan Perlakuan Elisitor Asam Salisilat	26
Tabel 3.2	Rancangan Percobaan Perlakuan Prekursor Feeding Fenilalanin ..	26
Tabel 4.1	Konsentrasi Total Asam Fenol dan Berat Kering Sel <i>M.oleifera</i> Pada Perlakuan Elisitor Asam Salisilat.....	32
Tabel 4.2	Konsentrasi Total Asam Fenol dan Berat Kering Sel <i>M.oleifera</i> Pada Perlakuan Fenilalanin.	34

DAFTAR GAMBAR

		Halaman
Gambar 2.1	<i>M. oleifera</i> Lam.....	6
Gambar 2.2	Buah <i>M. oleifera</i> Lam.....	7
Gambar 2.3	Struktur Kimia Asam Tannat.....	10
Gambar 2.4	Jalur Biosintesis Asam Fenol	11
Gambar 2.5	Asam Salisilat.....	12
Gambar 2.6	Mekanisme Umum Respon Tumbuhan Terhadap Elisitor.....	13
Gambar 2.7	Kultur Suspense Anggur.....	16
Gambar 2.8	Grafik Pertumbuhan Suspensi Sel	17
Gambar 4.1	Hasil Induksi Kalus Eksplan Biji <i>M. oleifera</i> Pada Medium MS 0,5 Ppm 2,4 D Dan 1ppm BAP.....	30
Gambar 4.2	Hasil Reaksi Senyawa Fenol Dengan Reagen Folin Ciocalteu....	31
Gambar 4.3	Reaksi Senyawa Fenol Dengan Reagen Folin – Ciocalteu.....	31

DAFTAR LAMPIRAN

		Halaman
Lampiran 1:	Diagram Alir Metode Penelitian...	49
Lampiran 2:	Komposisi Media Dasar Ms (<i>Murashige And Skoog</i>).....	50
Lampiran 3:	Komposisi Larutan Stok Media Ms (<i>Murashige And Skoog</i>).....	51
Lampiran 4:	Skema Pembuatan Media Dasar Ms (<i>Murashige And Skoog</i>).....	52
Lampiran 5:	Skema Kerja Ekstraksi Asam Fenol.....	53
Lampiran 6:	Pembuatan Standart Asam Tanat.....	54
Lampiran 7:	Ekstraksi Total Asam Fenol	55
Lampiran 8:	Estimasi Total Asam Fenol Menggunakan Spektofotometer	58
Lampiran 9:	Data Absorbansi Dan Konsentrasi Ekstrak Asam Fenol Perlakuan Asam Salisilat	59
Lampiran 10:	Anova One Way Total Asam Fenol Perlakuan Asam Salisilat	60
Lampiran 11:	Kurva Standar Asam Tanat	61
Lampiran 12:	Data Absorbansi Dan	

	Konsentrasi Ekstrak Asam Fenol Perlakuan Fenilalanin	61
Lampiran 13:	Anova One Way Total Asam Fenol Perlakuan Fenilalanin	62
Lampiran 14:	Uji Tukey Konsentrasi Asam Fenol Perlakuan Fenilalanin	62
Lampiran 15:	Data Berat Kering Sel Perlakuan Fenilalanin	63
Lampiran 16:	Data Berat Kering Sel Perlakuan Asam Salisilat	63

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Moringa oleifera merupakan tanaman yang berpotensi tinggi untuk dikembangkan dalam sektor industri seperti industri farmasi, makanan, dan kosmetik (Rebecca dkk, 2012). Keberadaan tanaman ini melimpah di Indonesia termasuk di pulau Madura (Barselia dkk., 2014) dan Nusa Tenggara Timur (Lutfiyah, 2012). Masyarakat di Indonesia biasanya menyebut *M. oleifera* sebagai kelor (jawa) dan maronggih (madura) (Krisnadi, 2012). Selama ini pemanfaatan tanaman ini hanya terbatas sebagai sumber pangan, tanaman pagar hidup, batas tanah ataupun penjalar tanaman lain (Lutfiyah, 2012) seperti penopang tanaman cabe jamu (Barselia dkk., 2014).

M. oleifera telah diketahui sebagai tanaman yang kaya akan senyawa antioksidan (Coppin, 2012). Senyawa antioksidan adalah senyawa yang dapat menetralkan radikal bebas. Radikal bebas merupakan molekul yang tidak stabil dan sangat reaktif karena mengandung satu atau lebih elektron tidak berpasangan pada orbital terluarnya. Adanya reaksi ini dalam tubuh akan menimbulkan berbagai penyakit seperti kanker dan penyakit degeneratif lainnya. Senyawa antioksidan yang terkandung pada *M. oleifera* yaitu polifenol, flavonoid, dan alkaloid (Coppin, 2012). Salah satu senyawa yang berperan penting sebagai antioksidan yaitu fenol yang terdiri dari quercetin, rutin, catechin, dan proanthocyanidin (Santos & scarlbert, 2000).

Senyawa metabolit sekunder yang menjadi fokus utama dalam penelitian akhir – akhir ini yaitu senyawa fenol karena berperan sebagai antioksidan untuk melawan penyakit kanker, kardiovaskular, neurodegeneratif (Riedel dkk, 2010), anti bakteri, dan anti tumor (Guererro dkk, 2009). Akan tetapi, proses ekstraksi senyawa metabolit sekunder dari *M. oleifera* masih belum efektif karena membutuhkan material dalam jumlah besar, padahal waktu penanamannya lama dan lahan budidaya yang

terbatas. Oleh karena itu, diperlukan langkah alternatif untuk meningkatkan produksi senyawa metabolit sekunder menggunakan kultur suspensi yang diberi perlakuan elisitor (Raskin dkk., 2002). Langkah lain yang dapat digunakan adalah dengan menggunakan teknik prekursor *feeding* (Smetanska, 2008). Elisitor yang biasa digunakan dalam proses ini adalah asam salisilat dan asam jasmonat (Sharma dkk, 2011). Sedangkan prekursor *feeding* yang biasa digunakan adalah fenilalanin (Shinde dkk, 2009).

Fenilalanin merupakan prekursor metabolit pada jalur phenilpropanoid (Shinde dkk, 2009). Penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa terdapat peningkatan kandungan senyawa total fenol pada kultur suspensi anggur menggunakan elisitor asam salisilat dan prekursor *feeding* fenilalanin (Riedel dkk, 2012). Saat ini, penelitian mengenai pengaruh prekursor *feeding* dan elisitor terhadap kandungan total asam fenol pada *M. oleifera* masih belum dilakukan. Berdasarkan latar belakang tersebut, maka perlu dilakukan penelitian mengenai pengaruh asam salisilat sebagai elisitor dan fenilalanin sebagai prekursor *feeding* terhadap kandungan total asam fenol pada kultur suspensi sel *M. oleifera* Lam.

1.2 Permasalahan

Permasalahan pada penelitian ini yaitu bagaimana pengaruh asam salisilat dan fenilalanin terhadap kandungan total asam fenol pada kultur suspensi sel *M. oleifera* Lam.

1.3 Tujuan

Tujuan dalam penelitian ini yaitu mengetahui pengaruh asam salisilat sebagai elisitor dan fenilalanin sebagai prekursor *feeding* terhadap kandungan total asam fenol pada kultur suspensi sel *M. oleifera* Lam.

1.4 Batasan masalah

Batasan masalah pada penelitian ini adalah

1. *M. oleifera* yang digunakan berasal dari pulau Poteran, Madura Jawa Timur.
2. Elisitor dan prekursor *feeding* yang digunakan adalah asam salisilat (SA) dan fenilalanin (Phe).
3. Hasil senyawa metabolit sekunder yang diamati adalah total asam fenol.
4. Analisis total asam fenol dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer.

1.5 Manfaat

Manfaat yang didapatkan dari penelitian ini adalah

1. Mendapatkan konsentrasi elisitor dan prekursor *feeding* terbaik dalam penghasilan senyawa total asam fenol sehingga dapat digunakan dalam proses produksi.
2. Studi awal skala laboratorium dan hasil produksinya dapat dikembangkan dalam skala industri menggunakan bioreaktor.

“Halaman ini sengaja di kosongkan”

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Moringa oleifera* Lam.

2.1.1 Klasifikasi

M. oleifera Lam. merupakan salah satu spesies dari 14 spesies lain dari keluarga Moringaceae dan berasal dari India, Afrika, Amerika Selatan, Asia Selatan, Kepulauan Pasifik dan Karibia (Iqbal & Bhanger, 2006). Klasifikasi dari tanaman ini adalah

Regnum	: Plantae
Divisio	: Angiospermae
Classis	: Dicotyledonae
Ordo	: Capparales
Familia	: Moringaceae
Genus	: <i>Moringa</i>
Species	: <i>Moringa oleifera</i> Lam.

(USDA, 2015)

2.1.2 Morfologi

M. oleifera merupakan tanaman perdu yang memiliki tinggi tanaman antara 5 – 12 m dengan bentuk tajuk seperti payung terbuka (Coppin, 2012). Habitus berupa pohon berkayu dengan batang yang mudah patah dan berwarna kelabu. Percabangan batang simpodial yaitu batang pokok sukar ditentukan dan cabangnya memiliki pertumbuhan tegak lurus. Tanaman ini memiliki Perakaran tunggang dan berwarna putih (Krisnadi, 2012).

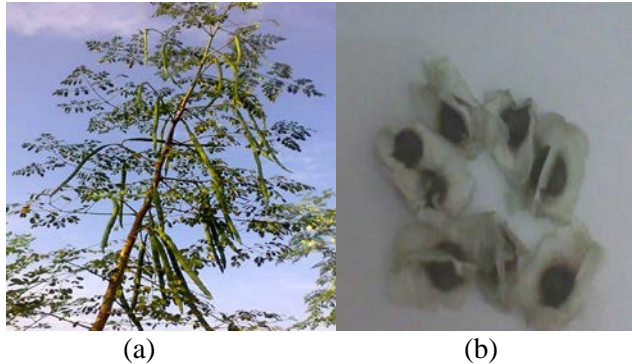
Daun dari tanaman ini merupakan daun majemuk, bertangkai panjang dan tersusun berseling dengan jumlah daun ganjil, warna helai daun saat muda adalah hijau muda kemudian hijau tua setelah dewasa (Gambar 2.1). Helai daun berbentuk

bulat telur dengan panjang 1,2 - 2 cm dan lebar 0,6 - 1cm, tipis, lemas, ujung dan pangkal daun tumpul dan memiliki tepi rata. Tulang daun menyirip (pinnate), permukaan atas dan bawah halus (Roloff dkk, 2009).



(a) (b)
Gambar 2.1 *M. oleifera* Lam. Dewasa (a) Dan *Seedling* (b).

Bunga berwarna putih kekuningan terdapat dalam pucuk lembaga di bagian ketiak batang dan tudung pelepah bunga berwarna hijau. Malai terkulai 10 – 15 cm, memiliki 5 kelopak yang mengelilingi 5 benang sari dan 5 staminodia. Buah berupa polong berbentuk segi tiga memanjang dengan panjang antara 20 - 60 cm, saat muda buah berwarna hijau dan menjadi coklat saat tua. Polong membuka menjadi 3 bagian ketika kering. Biji didalam polong berbentuk bulat, berwarna hijau terang saat muda dan berubah berwarna coklat kehitaman ketika polong matang dan kering. Biji terbungkus kulit biji berwarna kecoklatan yang memiliki tiga sayap putih yang menjalar dari atas ke bawah seperti pada Gambar 2.2 (Krisnadi, 2012).



Gambar 2.2 Buah (a) dan Biji (b) *M. oleifera* Lam.

2.1.3 Habitat dan penyebaran

M. oleifera berasal dari daerah Asia Selatan yang memiliki fluktuatif suhu yang cenderung tinggi yaitu antara -1°C sampai 3°C pada suhu rendah dan 38°C sampai 40°C pada suhu tinggi. Pada wilayah ini curah hujan bekisar antara 750 sampai 2200 mm per tahun. Sedangkan, pada daerah persebarannya tanaman ini dapat tumbuh pada suhu antara $12,6^{\circ}\text{C}$ sampai 40°C dengan curah hujan sekitar 500 mm pertahun. Tanaman ini sangat tahan terhadap kekeringan dan dapat tumbuh pada 1400 m diatas permukaan air laut atau daerah sepanjang aliran sungai. Selain itu, tanaman ini mampu hidup pada tanah berpasir atau tanah alluvial dimana tanah ini dapat diairi dengan baik akan tetapi memiliki kandungan bahan organik yang sangat rendah (Rollof dkk, 2009). Budidaya tanaman ini menggunakan biji atau stek batang. Akan tetapi, budidaya menggunakan stek batang dapat menyebabkan kematian pada tanaman induk (Mylene & Evalour, 2011).

2.2 Kandungan metabolit sekunder *M. oleifera* Lam.

Metabolit sekunder yang terdapat pada *M. oleifera* yaitu flavonoid, tanin, antraquinon, alkaloid, triterpenoid, saponoid, dan kadar glukosa yang rendah (Anwar dkk., 2007). Senyawa ini

dapat bermanfaat sebagai senyawa antioksidan dan anti inflamasi (Coppin, 2012). Senyawa antioksidan adalah senyawa yang dapat menetralkan radikal bebas. Radikal bebas merupakan molekul yang tidak stabil dan sangat reaktif karena mengandung satu atau lebih elektron tidak berpasangan pada orbital terluarnya. Adanya reaksi ini dalam tubuh akan menimbulkan berbagai penyakit seperti kanker dan penyakit degeneratif lainnya.

M. oleifera memiliki banyak potensi menguntungkan pada beberapa aspek. Hal ini dikarenakan adanya kandungan vitamin A, B kompleks, zat besi, kalsium dan protein seperti asam amino esensial (Sri dkk., 2011). Daun *M. oleifera* mengandung zat besi, protein dan beberapa asam amino esensial dalam jumlah tinggi sehingga dapat digunakan sebagai tambahan pangan (Roloff dkk., 2009). Pada usia daun yang berbeda *M. oleifera* dapat memiliki kandungan fenol dan flavonoid yang berbeda (Tabel 2.1) begitu juga pada proses ekstraksi, daun *M. oleifera* pada solven yang berbeda juga memiliki kandungan senyawa fenol dan flavonoid yang berbeda (Tabel 2.2). Selain itu juga terdapat senyawa fenol yang terdiri dari resveratrol, quercetin, rutin, catechin, dan proanthocyanidin (Santos & scarlbert, 2000) yang berfungsi sebagai senyawa antibakteri, antikanker, estrogen dan pelindung jantung (Guerrero dkk., 2009). Sedangkan senyawa flavonoid yang telah teridentifikasi adalah *flavonol glucoside (kaempferol 3-O-rutinoside, kaempferol 3-O-glicoside, dan quercetin 3-O-glucoside dan rutin)* (Maldini dkk, 2014).

Tabel 2.1 Kandungan fenol dan flavonoid pada ekstrak daun *M. oleifera* Lam. dengan umur yang berbeda (Sreelatha & Padma, 2009)

Ekstrak	Total fenol	Total flavonoid
Daun tua	45,81±0,02	27±0,03
Daun muda	36,02±0,01	15±0,02

Tabel 2.2 Kandungan fenol dan flavonoid pada ekstrak daun *M. oleifera* Lam. dengan *solvent* yang berbeda (Charoensin, 2014).

Solven	Total fenol	Total flavonoid
Methanol	216,45±4,64	65,38±2,37
Dichloromethan	100,12±3,70	40,14±3,31

2.3 Senyawa fenol

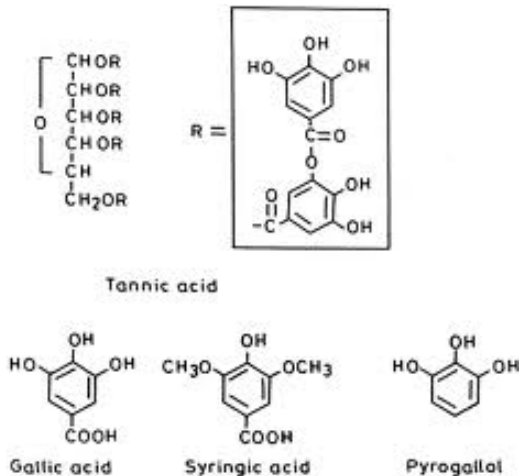
Fenol merupakan senyawa yang terdiri dari satu atau lebih cincin aromatik yang mengalami hidroksilasi atau penambahan gugus hidroksil. Senyawa fenol dapat dikategorikan sebagai senyawa flavonoid dan non flavonoid. Kelompok senyawa fenol non flavonoid utama adalah asam fenol dengan atom C6-C1, hydroxinamat dan derivatnya, dan stibene polifenol C6-C2-C6 (Jaganath & Crozier, 2010). Polifenol merupakan antioksidan terbesar yang terdiri dari flavonoid, antosianin, asam fenol, lignan dan stilbenes. Senyawa ini merupakan derivat dari fenilalanin dan mengandung cincin aromatik dengan gugus hidroxil yang reaktif (Signorelli & Ghidoni, 2005).

2.3.1 Asam fenol

Asam fenol diketahui sebagai hydroxybenzoat dan biasanya direpresentasikan sebagai *gallic acid*, *p-hydroxybenzoic acid*, *protocatechuic acid*, *vanillic acid*, *tannic acid*, dan *syringic acid* (Gambar 2.3). Asam fenol biasanya terdapat dalam struktur yang kompleks seperti lignin dan tannin. Selain itu, bisa juga sebagai derivat gula dan asam organik pada tanaman (Jaganath & Crozier, 2010).

Gallic acid merupakan bagian dasar dari sub unit ellagitanin yang diklasifikasikan sebagai hidrosabel tannin. Asam fenol bebas dan terikat juga ditemukan di tanaman sereal. Perbedaan butir seperti sorghum (*Sorghum bicolor*), millet (*Pennisetum americanum*), barley (*Hordeum vulgare*), wheat (*Triticum vulgare*), padi (*Oryza sativa*), oat (*Avena sativa*), dan rye (*Secale cereale*) mengandung asam fenol yang beragam

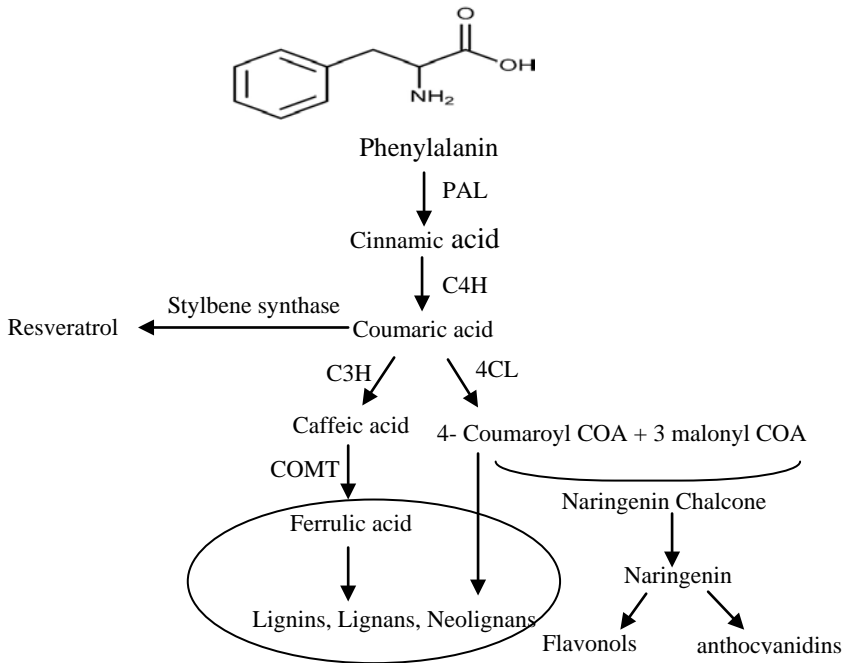
seperti *gallic acid*, *protocatechuic acid*, *p-hydroxybenzoic acid*, *gentisic acid*, asam salisilat, *vanillic acid*, dan *syringic acid* (Dykes & Rooney, 2007).



Gambar 2.3 Struktur Kimia Asam Tannat (Jaganath & Crozier, 2010).

Senyawa fenol berperan sebagai antioksidan untuk melawan penyakit kanker, kardiovaskular, neurodegeneratif (Riedel dkk, 2010), anti tumor, anti bakteri, estrogen dan pelindung jantung (Guererro dkk, 2009). Selain itu, Senyawa fenol pada tanaman merupakan senyawa yang sangat melimpah dan penting untuk pertahanan tanaman (Dong dkk, 2010).

Pada jalur fenilpropanoid, *immediate* prekursor pada biosintesis asam fenol adalah *P-Coumaroyl* COA dan *malonyl* COA dimana kedua senyawa ini adalah turunan yang terbentuk dari fenilalanin (Soleas dkk., 2000). Enzim PAL (*phenylalanine ammonia lyase*) merupakan enzim kunci dalam proses biosintesis senyawa fenol dari asam amino fenilalanin (Gambar 2.4).



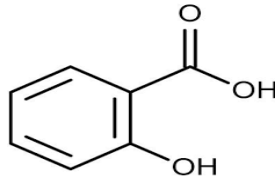
Gambar 2.4 Jalur Biosintesis Asam Fenol Melalui Jalur Fenilpropanoid (Riedel dkk., 2012).

2.4 Elisitor

Elisitor merupakan senyawa yang dapat menstimulasi beberapa jenis pertahanan tubuh tanaman. Elisitor dibedakan menjadi 2 yaitu eksogen dan endogen. Elisitor endogen merupakan elisitor yang terdapat dalam sel tumbuhan itu sendiri. Sedangkan elisitor eksogen berasal dari luar yang ditambahkan pada medium pertumbuhan. Elisitor dapat meningkatkan produksi senyawa metabolit sekunder dimana metabolit sekunder yang dihasilkan digunakan untuk respon pertahanan oleh tanaman. Secara umum elisitor dapat diklasifikasikan menjadi 2 yaitu abiotik dan biotik (Patel & Krishnamurthy, 2013).

Elisitor abiotik meliputi ion logam dan senyawa inorganik. Sedangkan elisitor biotik meliputi fungi, bakteri, virus atau

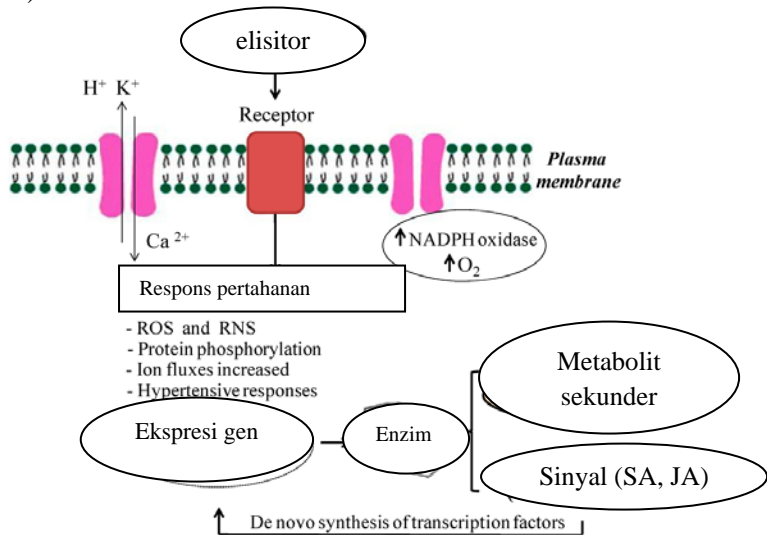
herbivora, komponen dinding sel secara kimiawi yang akan dikeluarkan oleh tanaman ketika patogen atau herbivora menyerang tanaman (Zhao dkk, 2005). Salah satu elisitor yang dapat digunakan adalah hormon tanaman. Asam salisilat (Gambar 2.5) dan asam jasmonat diketahui sebagai sinyal kimia untuk gen yang berperan dalam respon pertahanan tanaman. Secara umum asam salisilat mengatur resistensi pada patogen seperti jamur, bakteri dan virus (Patel & Krishnamurthy, 2013).



Gambar 2.5 Asam Salisilat (Hayat dkk, 2007).

Pada Gambar 2.6 dipaparkan mekanisme secara umum respon sel tumbuhan ketika diberikan elisitor. Proses ini diawali terjadinya influks atau pemasukan Ca^{2+} ke sitoplasma dari lingkungan ekstraseluler dan tempat penyimpanan Ca^{2+} intraseluler (Gelli dkk, 1997). Perubahan secara cepat terjadi pada pola fosforilasi protein dan aktivasi protein kinase sebagai mekanisme elisitasi (Romeis, 2001). Selain itu, ada pula yang menyatakan adanya stimulasi *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) dan aktivasi protein-G (Agrawal dkk, 2002). Menurut Armero dan Tena (2001) bahwa terjadi asidifikasi sitoplasma karena inaktivasi H^+ -ATPase, penurunan polarisasi membran, dan peningkatan pH ekstraseluler. Sedangkan Apostol dkk. (1989) menjelaskan tentang produksi ROS seperti anion superoxide dan H_2O_2 yang mempunyai efek antimikrobia yang berkontribusi dalam pembentukan derivatif asam lemak. ROS berhubungan dengan *cross-linking cell-wall-bound proline-rich protein*, H_2O_2 dapat berperan sebagai secondary messenger dan menyebabkan aktivasi transkripsi gen-gen pertahanan. Hipotesis lainnya menyatakan bahwa akumulasi *pathogenesis related protein*

seperti kitinase dan glukonase, endopoligalakturonase yang berperan dalam pelepasan sinyal oligomer pectic (elisitor endogen), *hydroxyproline-rich glycoprotein*, dan inhibitor protease (Memelink dkk, 2001). Semua elisitor tidak sama dalam tahapan responnya tergantung asal, spesifisitas, konsentrasi, lingkungan, tahap siklus pertumbuhan, dan nutrisinya (Namdeo, 2007).



Gambar 2.6 Mekanisme Umum Respon Tumbuhan Terhadap Elisitor (Baenas dkk, 2014).

Produk yang diakumulasi oleh tanaman menggunakan elisitasi akan berbeda hasilnya pada tiap tanaman. Pada kultur jaringan, pemberian elisitor dapat dimasukkan pada medium pertanaman. Optimasi elisitor pada medium pertanaman bergantung pada spesifitas, konsentrasi, waktu pemberian, dan jenis elisitor. Selain itu, umur kultur dan komposisi nutrisi serta hormon pertanaman juga turut berpengaruh (Patel & Krishnamurthy, 2013). Penggunaan elisitor amonium nitrat

pada medium kultur suspensi anggur (*Vitis vinifera*) dapat meningkatkan kandungan senyawa fenol dan resveratrol (Sae-Lee dkk, 2011). Kombinasi penggunaan elisitor asam jasmonat dengan β -Glucan dapat meningkatkan senyawa resveratrol pada kultur suspensi anggur (*Vitis vinifera*) (Vuong dkk, 2014).

2.5 Prekursor feeding

Pada tahun 1965, Chan dan Stabe pertama kali mengetahui pengaruh prekursor feeding pada pembentukan alkaloid. Sejak media produksi dikembangkan pertama kali oleh Zenk pada tahun 1971, prekursor feeding telah menjadi hal yang populer untuk peningkatan produksi metabolit sekunder pada kultur sel tumbuhan. Pada dasarnya, ide penelitian ini adalah urutan pembentukan senyawa metabolit sekunder baik yang berasal dari senyawa intermediet atau senyawa asal dapat meningkatkan produk hasil akhir dari proses tersebut. Banyak pendekatan dari immediet prekursor feeding yang prosesnya dapat dideskripsikan lebih akurat sebagai satu langkah biotransformasi untuk menemukan metabolit primer (Fowler & Graham, 1992).

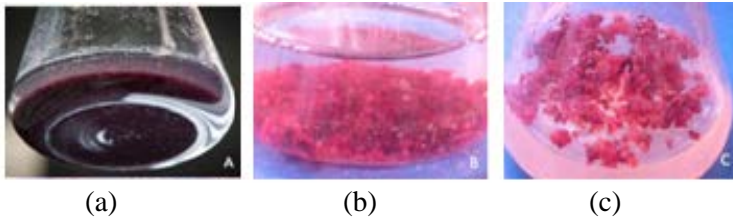
Prekursor feeding pada kultur jaringan dapat meningkatkan metabolit sekunder dengan cara mempengaruhi jalur biosintesis sehingga dapat mengaktivasi dan meningkatkan metabolit sekunder (Smetanska, 2008). Strategi prekursor feeding telah dilaporkan efektif menstimulasi akumulasi senyawa betaxanthin pada kultur rambut akar (Bohm & Mack, 2004). Jalur biosintesis dapat digunakan sebagai kunci dalam industri obat - obatan karena dapat memberikan dampak yang drastis pada tingkat komersial bila menggunakan prekursor. Isofalavon dan flavonoid yang berasal dari phenilalanin merupakan prekursor metabolit pada jalur phenilpropanoid (Shinde dkk, 2009).

Penambahan phenilalanin pada medium diharapkan dapat meningkatkan senyawa target (metabolit sekunder) (Shinde dkk, 2009). Hasil penelitian Riedel dkk (2012) menunjukkan adanya

peningkatan kandungan asam fenol pada kultur suspensi anggur menggunakan elisitor berupa Asam jasmonat, asam salisilat, Etephon dan prekursor berupa Phenilalanin dan *Shicimic acid*. Sedangkan pada *Moringa oleifera*, penambahan *nicotinic acid* sebagai prekursor feeding dilaporkan telah meningkatkan kandungan senyawa trigonelin yang berasal dari jenis alkaloid (Mathur & Kamal, 2012). Penggunaan prekursor phenilalanin telah dilaporkan mengakibatkan peningkatan akumulasi silymarin dan naringenin pada kultur rambut akar *Silybum marianum* (Rahimi dkk, 2011).

2.6 Kultur suspensi sel

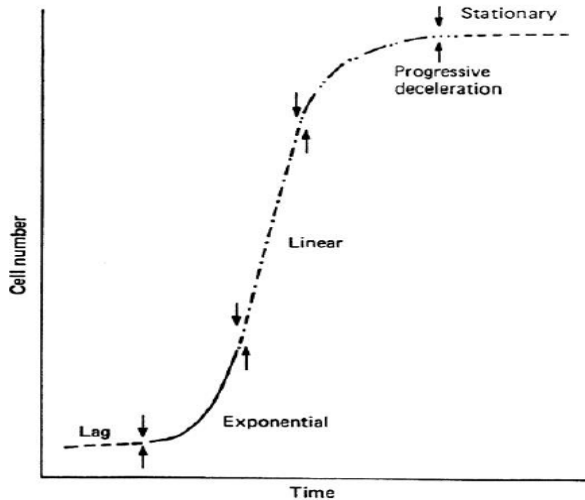
Kultur suspensi terdiri atas sel tunggal, kelompok sel kecil dan agregat sel besar yang terdispersi dalam medium cair dan aktif tumbuh dalam kondisi agitasi dan aerasi (Dwimahyani, 2007). Pada kondisi inkubasi, sel membelah secara aktif sehingga terjadi peningkatan sel. Suspensi sel dapat di subkultur dengan cara mengambil kultur suspensi dengan pipet dan dimasukkan pada medum cair baru da proses subkultur harus dilakukan secara teratur. Suspensi sel terdiri dari dari banyak sel sehingga sulit untuk membedakan sel induk hal ini dikarenakan sel yang terdapat pada kultur suspensi sel memiliki morfologi sel yang homogen dan waktu pembelahan sel antara 24- 72 jam (Chakravarthy, 2012). Salah satu contoh kultur suspensi sel anggur dengan dan tanpa perlakuan elisitor terdapat pada Gambar 2.7.



Gambar 2.7 Kultur Suspensi Anggur (*Vitis Vinifera*) (Riedel dkk, 2012)

(keterangan (a), perlakuan elisitor JA (asam jasmonat), (b) tanpa perlakuan elisitor, (c) agregat kalus aggur (*V. vinifera*))

Kultur ini biasanya diinisiasi dengan cara memindahkan potongan kalus pada medium cair yang diagitasi selama periode kultur. Pada saat kalus pertama kali diletakkan pada medium kultur, maka terjadi fase lag dimana sel mulai beradaptasi dengan lingkungan, kemudian dilanjutkan dengan fase eksponensial yang ditandai dengan peningkatan jumlah kepadatan, setelah itu sel akan memasuki fase stasioner dimana sel berada pada fase tetap atau tidak terjadi pembelahan sel seperti pada Gambar 2.8 (Dwimahyani, 2007). Untuk menjaga agar sel tetap viabel maka biasanya akan dilakukan proses subkultur. Kepadatan sel maksimum didapatkan antara 18- 25 hari meskipun masa aktif pembelahan sel kurang dari 6 - 9 hari. Agitasi pada kultur sel harus dilakukan untuk memberikan aerasi. Volume medium cair yang digunakan berkaitan dengan ukuran labu, yang berpengaruh pada aerasinya. medium cair biasanya berisi 20% dari volume total labu (Chakravarthy, 2012).



Gambar 2.8 Grafik Pertumbuhan Suspensi Sel : Jumlah Total Sel per Unit Volume terhadap Waktu (Dwimahyani, 2007)

Kultur suspensi sel tidak hanya digunakan untuk propagasi akan tetapi juga digunakan untuk mempelajari fisiologi, biokimia, dan aspek molekular tanaman. Sebagai contoh isolasi sel tanaman digunakan untuk mempelajari fotosintesis, ion transport (Rao, 2002 dan Davey, 2005), produksi metabolit sekunder (Dewitt, 2003), pertumbuhan dan perkembangan sel dan pemrograman kematian sel (García-Heredia, 2008). Selain itu, juga dapat digunakan dalam proses penghasilan senyawa metabolit sekunder (Chakravarthy, 2012).

Pembentukan senyawa metabolit sekunder dapat dilakukan dengan cara sistem kultur tunggal atau sistem kultur ganda. Pada proses sistem kultur ganda, tahap pertama dilakukan perkembangan pertumbuhan sel pada medium pertumbuhan standar dan pada tahap kedua dilakukan pemindahan sel pada medium produksi yang berisi senyawa yang dapat mensintesis metabolit sekunder. Sedangkan pada sistem kultur tunggal, tahap

pertumbuhan dan produksi dilakukan secara bersamaan pada tempat yang sama (Chakravarthy, 2012).

2.7 Metode ekstraksi

Ekstraksi merupakan suatu proses penyarian senyawa kimia yang terdapat didalam bahan alam atau sel dengan menggunakan pelarut dan metode tertentu. Ekstrak merupakan sediaan kental yang didapat dari proses ekstraksi senyawa aktif simplisia nabati atau hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian pelarut diuapkan sehingga menghasilkan serbuk dan diberi perlakuan sesuai standar yang telah ditetapkan (Handa dkk, 2008). Proses ekstraksi yang sering dilakukan adalah menggunakan metode maserasi. Maserasi adalah proses pengekstrakan simplisia dengan menggunakan pelarut pada beberapa kali proses pengocokan dan pengadukan di suhu ruang. Maserasi kinetik berarti dilakukan dilakukan pengadukan secara terus menerus dan kontinyu. remaserasi dilakukan dengan pengulangan penambahan pelarut setelah dilakukan penyaringan maserat pertama dan seterusnya (Handa dkk, 2008).

Faktor -faktor yang mempengaruhi kualitas ekstrak antara lain, kualitas bahan baku yang digunakan, jenis pelarut yang digunakan dalam proses ekstraksi, metode ekstraksi yang digunakan maserasi, perkolasi, reperkolasi dan ekstraksi arus balik, ukuran partikel bahan, suhu proses ekstraksi, pH ekstrak dan metoda pemurniannya (Hernani dkk, 2007). Pemilihan pelarut pada umumnya dipengaruhi oleh faktor-faktor antara lain :

1. Selektivitas pelarut digunakan untuk melarutkan semua zat yang akan diekstrak dengan cepat dan sempurna.
2. Titik didih pelarut yaitu pelarut yang digunakan harus mempunyai titik didih yang cukup rendah sehingga pelarut mudah diuapkan tanpa menggunakan suhu tinggi pada proses pemurnian.
3. Pelarut tidak larut dalam air

4. Pelarut bersifat inert sehingga tidak bereaksi dengan komponen lain
5. Harga pelarut semurah mungkin.
6. Pelarut mudah terbakar.

(Susanti dkk, 2012)

Pelarut yang biasa digunakan dalam proses ekstraksi antara lain :

1. Etanol biasa digunakan sebagai pelarut dalam laboratorium karena mempunyai kelarutan yang relatif tinggi dan bersifat inert sehingga tidak bereaksi dengan komponen lainnya. Etanol memiliki titik didih yang rendah sehingga memudahkan pemisahan minyak dari pelarutnya dalam proses distilasi.
2. n-Heksana merupakan pelarut yang paling ringan dalam mengangkat minyak yang terkandung dalam biji-bijian dan mudah menguap sehingga memudahkan untuk refluks. Pelarut ini memiliki titik didih antara 65–70 °C.
3. Isopropanol merupakan jenis pelarut polar yang memiliki massa jenis 0,789 g/ml. Pelarut ini mirip dengan etanol yang memiliki kelarutan yang relatif tinggi dan memiliki titik didih 81-82°C.
4. Etyl Asetat merupakan jenis pelarut yang bersifat semi polar. Pelarut ini memiliki titik didih yang relatif rendah yaitu 77°C sehingga memudahkan pemisahan minyak dari pelarutnya dalam proses destilasi.
5. Aseton merupakan pelarut yang larut dalam berbagai perbandingan dengan air, etanol dan dietil eter. Aseton digunakan untuk membuat plastik, serat, obat-obatan, dan senyawa-senyawa kimia lainnya.
6. Metanol merupakan pelarut yang paling banyak digunakan dalam proses isolasi senyawa organik bahan alam.

(Susanti dkk, 2012)

“Halaman ini sengaja di kosongkan”

BAB III METODOLOGI

3.1 Waktu dan tempat pelaksanaan

Penelitian ini dilaksanakan pada Maret sampai Juli 2015 di Laboratorium Botani, Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman, Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi, dan Laboratorium Zoologi Biologi Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya.

3.2 Metode yang digunakan

3.2.1 Pembuatan larutan stok ZPT

3.2.1.1 Stok ZPT 2,4D

Pembuatan stok ZPT 2,4, D 100 ppm dilakukan dengan menimbang 2,4, D (*Phyto tech. Lab*) sebanyak 10 mg menggunakan neraca analitik (*Boeco, Germany*), dimasukkan pada erlenmeyer, ditambahkan KOH 1N dan dipanaskan, ditambah aquadest 50 ml sambil terus diaduk sampai homogen dan dipanaskan. Kemudian ditambah aquadest sampai 100 ml dan diaduk sampai homogen kembali. Larutan stok dituang pada botol kaca 200 ml dan ditutup dengan rapat, diberi label 2,4, D 100 ppm (100 ml) dan disimpan di refrigerator.

3.2.1.2 Stok ZPT BAP

Pembuatan larutan stok ZPT BAP 100 ppm dilakukan dengan menimbang BAP (*Phyto tech. Lab*) sebanyak 10 mg menggunakan neraca analitik (*Boeco, Germany*), dimasukkan pada erlenmeyer, ditambahkan 10 tetes HCL 1N dan dipanaskan, ditambah H₂O 20 ml sambil terus diaduk dan dipanaskan. Kemudian ditambah aquadest sampai 100 ml dan diaduk sampai homogen. Larutan stok dituang pada botol kaca 200 ml dan ditutup dengan rapat, diberi label BAP 100 ppm (100 ml) dan disimpan di refrigerator.

3.2.2 Pembuatan stok fenilalanin dan asam salisilat

3.2.2.1 Stok fenilalanin

Pembuatan larutan stok fenilalanin 1000 ppm dilakukan dengan menimbang 10 mg fenilalanin menggunakan neraca analitik (*Boeco, Germany*), dimasukkan pada erlenmeyer, dilarutkan pada 10 ml aquadest sambil terus diaduk. Kemudian larutan stok disaring dengan kertas saring Whatman (*Whatman International Ltd., England*) no. 42 pada botol kaca 100 ml, ditutup dengan rapat, diberi label PHE 1000 ppm dan disimpan dalam refrigerator (Masoumian dkk, 2011).

3.2.2.2 Stok asam salisilat

Pembuatan larutan stok asam salisilat 1000 ppm dilakukan dengan menimbang 10 mg asam salisilat menggunakan neraca analitik (*Boeco, Germany*), dimasukkan pada erlenmeyer, dilarutkan pada 10 ml aquadest sambil terus diaduk. Kemudian larutan stok dimasukkan pada botol kaca 100 ml, ditutup dengan rapat, diberi label SA 1000 ppm dan disterilisasi dengan *autoclave* selama 20 menit pada suhu 121⁰C tekanan 1,5 atm.

3.2.3 Pembuatan medium induksi kalus

Medium yang digunakan untuk induksi kalus adalah medium MS (*Murashige and Skoog*) padat dengan penambahan ZPT berupa 2,4 D dan BAP (Evans dkk., 2003). Pembuatan medium MS padat 1 L dilakukan dengan cara erlenmeyer 1000 ml berisi 500 ml aquades, ditambahkan masing – masing stok A dan B 20 ml, stok C dan D 10 ml, stok E dan F 5 ml, stok vitamin 1 ml, stok myoinositol 10 ml, ZPT 2,4 D 5 ml (0,5 ppm), BAP 10 ml (1 ppm), 30 gram sukrosa dan diaduk sampai homogen. Kemudian ditambah aquadest sampai 1000 ml dan pH di ukur sebesar 6 menggunakan kertas pH lalu ditambahkan 8 gram agar- agar diaduk dan dipanaskan. Setelah itu dituang dalam botol kultur steril dan disterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121⁰C tekanan 1,5 atm selama 30 menit setelah dingin medium dikeluarkan dan disimpan di rak kultur. Pemberian ZPT

2,4 D 0,5 ppm dan BAP 1 ppm dihitung menggunakan rumus pengenceran:

$$M1.V1 = M2.V2$$

Dimana M1= konsentrasi awal
M2= konsentrasi akhir
V1= volume awal
V2= volume akhir

3.2.4 Sterilisasi

Sterilisasi peralatan kultur seperti botol kultur, pinset, scalpel, cawan petri, dan botol dicuci bersih dan dikeringkan. Pinset, scalpel, gunting, cawan Petri dan pipet dibungkus dengan kertas. Sedangkan botol kultur di rendam dengan sodium hipoklorit 20% (v/v) selama 1 hari, dan dikeringkan. Botol ditutup plastik dan diikat dengan karet. Semua peralatan kultur dan botol kultur di *autoclave* pada suhu 121⁰C dengan tekanan 1,5 atm selama 60 menit setelah dingin peralatan kultur yang steril dikeluarkan dan disimpan pada rak kultur.

Sterilisasi ruang kerja (*laminar air flow*) dengan cara lampu UV dinyalakan dan dibiarkan selama 2 jam kemudian dimatikan, blower dan lampu neon dinyalakan selama 30 menit dan ruang kerja siap digunakan. Sebelum proses inokulasi eksplan dilakukan, meja kerja terlebih dahulu dibersihkan dengan alkohol 70% dan dilap dengan *tissue* (Evans dkk., 2003).

Sterilisasi eksplan dilakukan dengan metode Mylene dan Evalour (2011). Biji *M. oleifera* yang telah masak dicuci dengan detergen selama 15 menit, dicuci dengan air mengalir kemudian biji direndam dengan fungisida 1;10 selama 15 menit, dan dicuci dengan air mengalir, dilanjutkan sterilisasi di LAF menggunakan NaOCl 3 % selama 30 menit dan dicuci dengan aquades steril 2 kali. Kemudian biji direndam dengan Alkohol 96% selama 5 menit. Selanjutnya biji dibakar sebanyak 3 kali dan kulit biji dibuang. Biji dipotong menjadi 3-4 bagian dan ditanam pada media induksi kalus.

3.2.5 Inokulasi eksplan

Inokulasi eksplan dilakukan di LAF (*Laminar air flow*). Eksplan steril diinokulasikan pada media induksi kalus dengan tambahan ZPT 2,4 D 0,5 ppm dan BAP 1. Eksplan diinkubasi pada suhu $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (Mathur & Kamal, 2012) kondisi gelap dan dilakukan sub kultur setiap tiga minggu sekali pada medium yang sama (Lalida, 2013).

3.2.6 Perlakuan dengan elisitor dan prekursor feeding

Pembuatan medium MS cair perlakuan yang di SA (asam salisilat) dan Phe (fenilalanin) dengan cara erlenmeyer 1000 ml berisi 500 ml aquades dan ditambahkan masing-masing stok A dan B 20 ml, stok C dan D 10 ml, stok E dan F 5 ml, stok vitamin 1 ml, stok myoinositol 10 ml, dan ZPT 2,4 D 0,5 ppm, BA 1 ppm, 30 gram sukrosa, diaduk sampai homogen. pH diukur menggunakan kertas pH dengan nilai 6 dan ditambah aquadest sampai 1000 ml diaduk, dituang pada botol steril 250 ml sebanyak 100 ml, ditutup dengan plastik, diikat karet steril dan sterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 30 menit.

3.2.6.1 Inokulasi kalus

kalus diinokulasikan sebanyak 300 mg dan dimasukkan botol steril 250 ml yang berisi 100 ml medium MS cair kemudian dinkubasi dengan *rotary shaker* kecepatan 120 rpm. Pada suhu $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Setelah 14 hari, medium ditambah asam salisilat 0 ; 0,5; 1; 1,5 ppm untuk perlakuan elisitor dan fenilalanin 0; 5; 10; 15 ppm untuk perlakuan prekursor feeding (Roy & Mukhopadhyay, 2012) dan dinkubasi dengan *rotary shaker* selama 5 hari kecepatan 120 rpm. Kondisi inkubasi kultur yaitu pada suhu $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

3.2.6.2 Proses pemanenan kultur suspensi sel

Setelah pemberian perlakuan elisitor dan prekursor feeding selama 5 hari maka kultur suspensi sel dipanen dengan cara menyaring medium kultur suspensi sel menggunakan kertas saring Whatman no. 42. Sel dan kalus yang tertampung ditimbang

menggunakan neraca digital steril untuk proses ekstraksi fenol dan perhitungan berat kering.

3.2.7 Estimasi total asam fenol

3.2.7.1 Ekstraksi asam fenol

Proses ekstraksi dilakukan dengan metode Vuong dkk., (2014) yaitu kultur suspensi sel disaring menggunakan kertas saring Whatman (*Whatman International Ltd., England*) no. 42 dan ditimbang sebanyak 100 mg dengan neraca digital, dihaluskan dengan mortar, dicampur 10 ml ethanol 100 % dan 5 ml 0,1 % HCl kemudian divortex dengan kecepatan 2500 rpm selama 10 menit. Selanjutnya didiamkan pada *rotary shaker* selama 30 menit untuk proses maserasi. Campuran ekstrak dan *solvent* disentrifugasi selama 20 menit dengan kecepatan 2500 rpm dan supernatan diambil untuk diukur kandungan fenol intraselularnya.

3.2.7.2 Kuantifikasi menggunakan spektrofotometri UV-Vis

Kuantifikasi Konsentrasi total asam fenol diukur menggunakan teknik Folin Ciocalteu (Vuong dkk, 2014). Supernatan yang diperoleh dari proses ekstraksi diambil sebanyak 1 ml ditambah dengan 2 tetes reagen Folin Ciocalteu, 1 ml Sodium karbonat 15% (w/v). Setelah 1 jam, sampel diukur absorbansinya pada panjang gelombang 760 nm (Cunnif, 1996) menggunakan spektrofotometer UV VIS (Genesys USA). Kurva kalibrasi asam fenol menggunakan asam tanat sebagai standar dan diplot antara konsentrasi 0,03, 0,05, 0,07 dan 0,09 ppm (Andryani dkk, 2010).

3.2.8 Penghitungan berat kering

Kalus/ sel yang masih tertampung di kertas saring ditimbang dan dioven pada suhu 80⁰C selama 1 hari. Setelah kering, kalus ditimbang di neraca *analytical balance*.

3.3 Rancangan penelitian dan analisis data

3.3.1 Rancangan penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah RAL (rancangan acak lengkap) dengan ulangan sebanyak 3 kali. Parameter pengamatan untuk analisa kuantitatif adalah konsentrasi total asam fenol pada perlakuan asam salisilat dan fenilalanin dan berat kering sel.

Tabel 3.1 Tabel rancangan percobaan perlakuan elisitor asam salisilat

SA	0 ppm	0,5 ppm	1 ppm	1,5 ppm
U1				
U2				
U3				

Keterangan : SA (asam salisilat)

Tabel 3.2 Tabel rancangan percobaan perlakuan prekursor feeding fenilalanin

PHE	0 ppm	5 ppm	10 ppm	15 ppm
U1				
U2				
U3				

Keterangan : PHE (fenilalanin)

3.3.2 Analisis data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian akan dianalisis secara statistik menggunakan ANOVA *one-Way* untuk mengetahui pengaruh konsentrasi asam salisilat dan fenilalanin terhadap kandungan total asam fenol kultur suspensi sel *M. oleifera*. Hipotesis yang digunakan adalah :

H_0 : tidak ada pengaruh nyata konsentrasi asam salisilat terhadap kandungan total asam fenol pada kultur suspensi sel *M. oleifera*.

- H_1 : terdapat pengaruh nyata konsentrasi asam salisilat terhadap kandungan total asam fenol pada kultur suspensi sel *M. oleifera*.
- H_0 : tidak ada pengaruh nyata konsentrasi fenilalanin terhadap kandungan total asam fenol pada kultur suspensi sel *M. oleifera*.
- H_1 : terdapat pengaruh nyata konsentrasi fenilalanin terhadap kandungan total asam fenol pada kultur suspensi sel *M. oleifera*

Jika H_0 ditolak atau terdapat pengaruh konsentrasi asam salisilat dan fenilalanin terhadap kandungan total asam fenol pada kultur suspensi sel *M. oleifera*, maka dilakukan uji lanjutan Tukey dengan taraf kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$) untuk mengetahui signifikansi perbedaan tiap perlakuan dengan kontrol.

“Halaman ini sengaja di kosongkan”

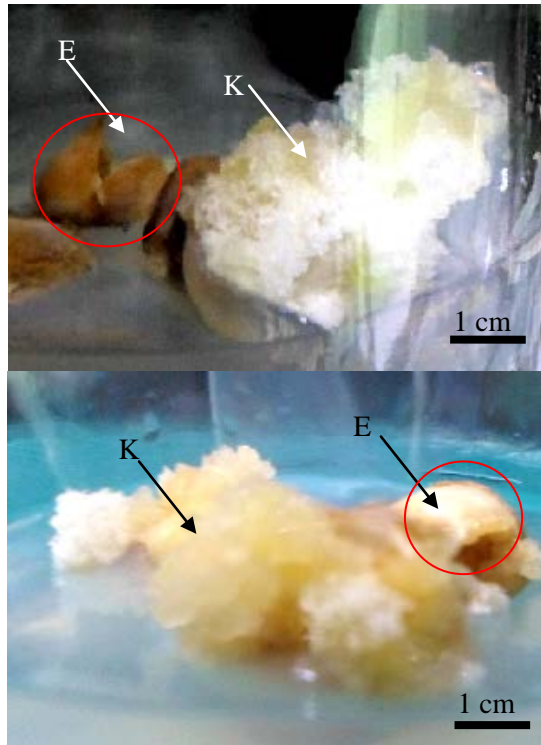
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil induksi kalus eksplan biji *M. oleifera* Lam.

Hasil induksi kalus biji *M. oleifera* pada medium MS dengan kombinasi ZPT 0,5 ppm 2,4 D dan 1ppm BAP menghasilkan kalus remah berwarna putih kekuningan, dan tumbuh setelah berumur 10 hari inokulasi. Respon pertama pada eksplan biji adalah terjadinya pembengkakan dan munculnya massa sel (kalus) pada bagian di sekitar irisan luka eksplan (Gambar 4.1). Hal ini sejalan dengan pernyataan Puspitasari & Soegihardjo (2002), bahwa kalus akan tumbuh pada bagian tepi eksplan dan setelah waktu tertentu kalus akan memenuhi seluruh permukaan eksplan.

Komposisi konsentrasi ZPT yang digunakan adalah 1 ppm BAP dan 0,5 ppm 2,4 D karena bertujuan untuk pembentukan kalus yang terus menerus sebagai sumber inokulum untuk kultur suspensi sel. Berdasarkan Skoog & Miller (1957) bahwa rasio konsentrasi sitokinin dan auksin intermediet akan menginduksi pembentukan kalus. Hasil penelitian yang telah dilakukan oleh Mylene & Evalour (2011) pada kotiledon biji *M. oleifera* juga menunjukkan peningkatan berat kalus yang signifikan pada perlakuan 0,5 mg/l BAP dan 1 mg/l 2,4 D.

Kalus yang dihasilkan merupakan kalus dengan tekstur remah dan berwarna putih. Adanya warna dan tekstur pada kalus dapat dipengaruhi oleh cahaya, ZPT dan asal eksplan. Kalus yang berwarna putih kekuningan merupakan kalus embriogenik (Peterson & Smith, 1991) yang terbentuk karena hasil aktivitas pembelahan sel yang meningkat (Pierik, 1987). Hasil ini sejalan dengan penelitian Mylene & Evalour (2011) pada induksi kalus kotiledon biji *M. oleifera* perlakuan 0,5 mg/l BAP dan 1 mg/l 2,4 D menghasilkan kalus remah berwarna putih. Hasil induksi kalus umbi iles-iles dengan kombinasi yang seimbang 1 mg/l 2,4-D + 1 mg/l BAP juga menghasilkan kalus berwarna putih (Azis dkk, 2014).



Gambar 4.1. Hasil Induksi Kalus Eksplan Biji *M. Oleifera* Pada Medium MS 0,5 ppm 2,4 D dan 1 ppm BAP.

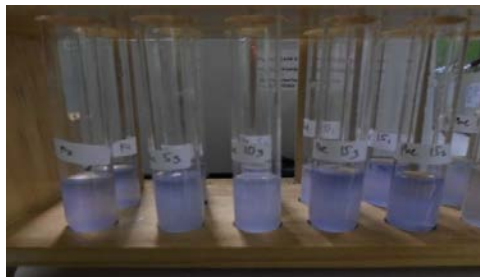
(Keterangan : K : kalus, E: eksplan)

4.2 Uji kualitatif keberadaan senyawa fenol

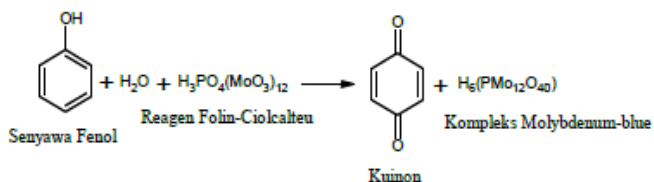
Kalus yang dihasilkan dari proses induksi kalus biji *M. oleifera* kemudian digunakan untuk proses kultur suspensi sel. Setelah kalus diinokulasikan pada medium cair dan diagitasi maka akan terbentuk remahan sel yang terdispersi dalam medium. Kultur suspensi sel dapat digunakan untuk proses peningkatan senyawa metabolit sekunder dengan dengan penambahan elisitor

(Vuong dkk, 2014) dan penambahan prekursor feeding (Smetanska, 2008).

Hasil kultur suspensi sel yang telah diberi perlakuan asam salisilat dan fenilalanin kemudian diekstraksi menggunakan etanol dan menghasilkan ekstrak senyawa total fenol yang tidak berwarna (bening) (Lampiran 8). Ekstrak kalus dari variasi konsentrasi perlakuan prekursor dan elisitor setelah diberi reagen Folin-Ciocalteu menghasilkan warna biru kromogen (Gambar 4.2). Warna biru kromogen merupakan hasil reaksi antara reagen Folin – Ciocalteu yang mengoksidasi gugus hidroksil (OH) dalam keadaan basa. Pada Gambar 4.3 memaparkan mekanisme reaksi antara senyawa fenol yang dapat direduksi oleh reagen Folin-Ciocalteu membentuk kompleks molybdenum yang berwarna biru (Jadhav dkk, 2012).



Gambar 4.2 Hasil Reaksi Senyawa Fenol Dengan Reagen Folin-Ciocalteu Yang Menghasilkan Warna Biru.



Gambar 4.3 Reaksi Senyawa Fenol Dengan Reagen Folin-Ciocalteu (Hardiana dkk, 2012).

4.3 Pengaruh asam salisilat pada kultur suspensi sel *M. oleifera* Lam.

Hasil uji Anova One Way $p \leq 0,092$ ($p \leq 0,05$) menunjukkan bahwa variasi konsentrasi asam salisilat tidak berpengaruh terhadap konsentrasi total asam fenol (Lampiran 10). Hal ini dapat dikarenakan adanya beberapa faktor yaitu *range* konsentrasi asam salisilat yang digunakan terlalu rendah yaitu 0,5 – 1,5 ppm. Selain itu, optimasi elisitor pada kultur suspensi sel bergantung pada spesifitas, konsentrasi, waktu elisitasi, dan spesies tanaman sehingga produk yang diakumulasi oleh setiap tanaman hasil elisitasi berbeda (Patel & Krishnamurthy, 2013).

Perlakuan elisitor asam salisilat dilakukan pada konsentrasi 0 ppm (kontrol), 0,5 ppm, 1 ppm dan 1,5 ppm. Penghitungan konsentrasi total asam fenol dengan menggunakan persamaan regresi kurva standar asam tanat (Lampiran 11) $y = 4,091x - 0,001$. Berdasarkan Tabel 4.1 diketahui bahwa perlakuan elisitor asam salisilat dari konsentrasi 0,5-1,5 ppm menunjukkan peningkatan kandungan senyawa total asam fenol dan penurunan berat kering sel dibandingkan kontrol. Konsentrasi total asam fenol tertinggi terdapat pada perlakuan elisitor asam salisilat konsentrasi 1 ppm yaitu $1,6067 \pm 0,458$ ppm dan konsentrasi terendah terdapat pada kontrol 0 ppm yaitu $0,6304 \pm 0,148$ ppm. Berat kering tertinggi terdapat pada perlakuan kontrol 0 ppm yaitu $25,1 \pm 2,42$ mg sedangkan berat kering terendah terdapat pada perlakuan 1,5 ppm yaitu $7,7 \pm 1,35$ mg.

Tabel 4.1 Konsentrasi total asam fenol dan berat kering sel *M. oleifera* pada perlakuan elisitor asam salisilat

Perlakuan	total asam fenol (ppm)	Berat kering sel (mg)
0 ppm	$0,6304 \pm 0,148$	$25,1 \pm 2,42$
0,5 ppm	$1,3613 \pm 0,413$	$10,0 \pm 0,95$
1 ppm	$1,6067 \pm 0,458$	$12,5 \pm 1,85$
1,5 ppm	$1,2399 \pm 0,211$	$7,7 \pm 1,35$

Konsentrasi 1 ppm asam salisilat terjadi peningkatan senyawa total asam fenol $1,6067 \pm 0,458$ ppm akan tetapi terjadi penurunan berat kering sel $12,5 \pm 1,85$ mg dibandingkan kontrol yaitu $0,6304 \pm 0,148$ untuk total asam fenol dan $25,1 \pm 2,42$ mg berat kering sel. Peningkatan senyawa total asam fenol dan penurunan berat kering ini terjadi merupakan salah satu respon tumbuhan ketika berada dalam kondisi tercekam untuk proses pertahanan diri, sehingga tumbuhan lebih banyak menghasilkan metabolit sekunder dibandingkan pertumbuhan. Hal ini sesuai dengan pernyataan Dong dkk (2010) bahwa salah satu senyawa yang berperan dalam mekanisme pertahanan tumbuhan adalah senyawa golongan fenol. Peningkatan fenol pada perlakuan elisitor asam salisilat diduga karena adanya peningkatan ROS (*Reactive oxygen species*) yang merupakan respon awal pemberian elisitor asam salisilat (Dong dkk, 2010). Selain itu, asam salisilat juga mempengaruhi pembentukan enzim PAL (*Phenylalanine Ammonia Lyase*) yang berperan dalam jalur fenilpropanoid dan beberapa enzim yang berperan untuk menstabilkan ROS seperti peroksidase dan SOD (*superoxide dismutase*) (War dkk, 2011).

Adanya peningkatan ROS (*Reactive Oxygen Spesies*) yang sejalan dengan peningkatan konsentrasi asam salisilat dapat menyebabkan terjadinya penurunan pertumbuhan sel. Menurut Dong dkk. (2010) meningkatnya kadar ROS pada sel dapat menyebabkan pengikatan langsung enzim katalase maupun makromolekul lain seperti protein dan lipid. Sehingga penumpukan ROS yang berlebihan dapat menyebabkan kerusakan oksidatif dan kematian sel. Selain itu, asam salisilat juga berpengaruh pada peningkatan hormon ABA (asam absisat) yang berfungsi dalam proses pertahanan terhadap cekaman abiotik dan dormansi. Hal ini dapat diduga bahwa dengan peningkatan ABA dapat menyebabkan penurunan pertumbuhan sel karena sel lebih banyak memproduksi senyawa pertahanan seperti fenol (Hara dkk, 2012). Hasil penelitian Dong dkk (2010) menunjukkan bahwa pada konsentrasi 3,125–12,5 mg/L

menunjukkan penurunan berat kering dan peningkatan senyawa fenol pada kultur sel *S. Miltiorrhiza*. Pada tanaman *Vitis vinifera* pemberian metil asam salisilat 50 μM terjadi penurunan berat kering $16,4 \pm 0,5$ g/l dibandingkan kontrol $17,6 \pm 0,9$ g/l dan kandungan senyawa fenol sebanyak 790 ± 30 mg/l dibandingkan kontrol 760 ± 60 mg/l setelah sepuluh hari masa inkubasi (Vuong dkk, 2014). Sedangkan pada tanaman Chickpea (*Cicer arietinum* L.) penambahan asam salisilat 1,5 mM dapat meningkatkan kandungan fenol < 60 μg setelah 96 jam masa inkubasi (War dkk, 2011).

4.4 Pengaruh fenilalanin pada kultur suspensi sel *M. oleifera* Lam.

Hasil uji Anova, $p \leq 0,010$ ($p \leq 0,05$) menunjukkan bahwa variasi konsentrasi fenilalanin berpengaruh terhadap kandungan total asam fenol (Lampiran 14). Penghitungan konsentrasi total asam fenol dengan menggunakan persamaan regresi kurva standar asam tanat (Lampiran) $y = 4,091x - 0,001$. Pada kultur suspensi sel *M. oleifera* prekursor *feeding* yang digunakan adalah fenilalanin dengan konsentrasi 0 ppm (kontrol), 5 ppm, 10 ppm dan 15 ppm.

Tabel 4.2 Konsentrasi total asam fenol dan berat kering sel *M. oleifera* pada perlakuan prekursor *feeding* fenilalanin

Perlakuan	total asam fenol (ppm)	Berat kering sel (mg)
0 ppm	$0,63^a \pm 0,15$	$6,9 \pm 0,80$
5 ppm	$1,60^b \pm 0,37$	$7,3 \pm 0,61$
10 ppm	$1,26^{ab} \pm 0,31$	$7,8 \pm 0,72$
15 ppm	$1,52^b \pm 0,29$	$9,7 \pm 1,46$

Keterangan: Hasil uji Tukey menunjukkan perbedaan huruf pada kolom yang sama berbeda signifikan ($p \leq 0,05$)

Berdasarkan Tabel 4.2, diketahui bahwa perlakuan prekursor *feeding* fenilalanin dari konsentrasi 0-15 ppm menunjukkan peningkatan berat kering dan total asam fenol dibandingkan

dengan kontrol. Berat kering tertinggi terdapat pada perlakuan prekursor *feeding* fenilalanin konsentrasi 15 ppm yaitu $9,7 \pm 1,46$ mg dan konsentrasi terendah terdapat pada kontrol 0 ppm yaitu $6,9 \pm 0,80$ mg. Konsentrasi fenol tertinggi terdapat pada perlakuan prekursor *feeding* fenilalanin konsentrasi 5 ppm yaitu $1,60 \pm 0,37$ ppm dan konsentrasi terendah terdapat pada kontrol 0 ppm yaitu $0,63 \pm 0,15$ ppm. Peningkatan berat kering sel dikarenakan penambahan asam amino eksogen seperti fenilalanin. Hal ini sesuai dengan pernyataan Kovacic^b dkk, (2007) yang menyatakan penambahan fenilalanin pada medium kultur suspensi sel dapat meningkatkan kandungan fenilalanin endogen. Sehingga kelebihan jumlah karbon yang dapat digunakan untuk proses pertumbuhan (Tissurat & Berhow, 2003).

Peningkatan total asam fenol karena fenilalanin merupakan prekursor utama dalam proses biosintesis senyawa fenol. Sehingga semakin banyak fenilalanin yang diserap maka semakin banyak pula senyawa total fenol yang dihasilkan. Hal ini sejalan dengan pernyataan Kovacic^a dkk, (2007) bahwa penambahan fenilalanin berpengaruh terhadap kandungan senyawa total asam fenol karena fenilalanin merupakan prekursor utama dalam proses metabolisme melalui jalur phenilpropanoid, sehingga peningkatan jumlah fenilalanin yang diserap akan meningkatkan penghasilan enzim PAL yang berpengaruh pada proses pembentukan asam fenol. Enzim PAL (*phenylalanine ammonia lyase*) merupakan enzim kunci dalam proses biosintesis senyawa fenol dari asam amino fenilalanin (Dong dkk, 2010). Hasil penelitian Roy & Mukhopadhyay (2012) pada tanaman *Mentha arvensis* menunjukkan penambahan fenilalanin konsentrasi 5 ppm mampu meningkatkan kandungan senyawa fenol $8,02 \pm 1,08$ mg/g dibandingkan kontrol yaitu $6,24 \pm 0,68$ mg/g dan meningkatkan berat basah kalus 0,30 gram dibandingkan kontrol yaitu 0,26 gram.

Konsentrasi fenilalanin 5 dan 15 ppm berpengaruh signifikan terhadap proses produksi senyawa total asam fenol pada kultur suspensi sel *M. oleifera* dibandingkan dengan kontrol.

Peningkatan senyawa metabolit sekunder seperti senyawa asam fenol dapat dikarenakan adanya peningkatan enzim PAL yang termasuk enzim kunci sebelum memasuki jalur asam sinamat (Roy & mukhopadhyay, 2012). Pada perlakuan fenilalanin konsentrasi 10 ppm terjadi penurunan senyawa fenol tetapi terjadi peningkatan berat kering sel. Hal ini dikarenakan pada proses kultur suspensi sel, kalus *M. oleifera* tidak terpencair secara sempurna sehingga luas permukaan sel yang kontak dengan medium juga lebih kecil. Hal ini menunjukkan bahwa ukuran sel mempengaruhi tingkat penyerapan nutrisi di medium tumbuh. Menurut Munk & Riley (1952) dalam Friebele dkk (1978) yang menyebutkan bahwa ukuran sel memiliki pengaruh terhadap tingkat penyerapan nutrisi, dimana ukuran sel yang lebih kecil memiliki kemampuan menyerap nutrisi lebih cepat dibandingkan sel yang berukuran lebih besar. Hal ini telah dibuktikan oleh Munk & Riley (1952) dengan mempelajari morfologi dan variasi ukuran sel fitoplankton dan menyimpulkan bahwa tingkat *sinking* atau penyerapan gizi yang baik terbatas pada ukuran sel $< 20\mu\text{m}$.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian dapat disimpulkan bahwa variasi perlakuan konsentrasi asam salisilat dan fenilalanin berpengaruh terhadap peningkatan kandungan total asam fenol pada kultur suspensi sel *M. oleifera* Lam konsentrasi total asam fenol tertinggi pada perlakuan asam salisilat konsentrasi 1 ppm $1,6067 \pm 0,458$ ppm dibandingkan kontrol yaitu $0,6304 \pm 0,148$ ppm dan perlakuan fenilalanin konsentrasi 5 ppm $1,60 \pm 0,37$ ppm dibandingkan kontrol yaitu $0,63 \pm 0,15$ ppm.

5.2. Saran

Saran untuk pengaruh asam salisilat dan fenilalanin terhadap kandungan total asam fenol pada kultur suspensi sel *Moringa oleifera* Lam. adalah

1. Perlu ditingkatkannya konsentrasi perlakuan asam salisilat dan fenilalanin
2. Peningkatan lama waktu pemberian cekaman,
3. Penambahan parameter uji seperti peningkatan enzim pal, peroksidase dan lain sebagainya.

“Halaman ini sengaja di kosongkan”

DAFTAR PUSTAKA

Agrawal, G. K., R. Rakwal, dan H. Iwahashi. 2002. Isolation of novel rice (*Oryza sativa* L.) multiple stress responsive MAP kinase gene, OsMSRMK2, whose mRNA accumulates rapidly in response to environmental cues. **Biochem Biophys Res Commun** 294: 1009-1016.

Andryani, D., P. I. Utami, Dan B.A. Dhiani. 2010. Penetapan Kadar Tanin Daun Rambutan (*Nephelium Lappaceum* L.) Secara Spektrofotometri Ultraviolet Visible. **Pharmacy** 07 (2):1-11

Anwar, F., Latif S., Ashraf M. dan Gilani A.H. 2007. *Moringa oleifera*: A Food Plant With Multiple Medicinal Uses. **Phytother. Res.**, 21: 17-25.

Apostol, L., P.F. Heinstejn, dan P.S Low. 1989. Rapid Stimulation Of An Oxidative Burst During Elicitation Of Cultured Plant Cells. **Plant Physio.** 190: 109-116.

Armero, J., dan M. Tena. 2001. Possible Role Of Plasma Membrane H⁺-Atpase In The Elicitation Of Phytoalexin And Related Isoflavone Root Secretion In Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Seedlings. **Plant Science.** 161: 791-798.

Aziz, M. M., E. Ratnasari, dan Y. S. Rahayu. 2014. Induksi Kalus Umbi Iles-Iles (*Amorphophallus muelleri*) dengan Kombinasi Konsentrasi 2,4-D dan BAP Secara In Vitro. **Lentera Bio** 3(2): 114.

Baenas, N., C. García-Viguera dan Diego A. Moreno. 2014. Elicitation: A Tool for Enriching the Bioactive Composition of Foods. **Molecules** 19:13541-13563.

Barselia, A. W., M. Yasir, E. H. Prameisti, Y. Permanasari, H. L. Rizkia, Ni Luh P. S. Dewi, D. R. Sinaga, W. Busse, S. Ulbricht, M. P. Koentjoro, dan E. N. Prasetyo. 2014. Study Analysis Of Developing *Moringa oleifera* As Potential Comodity In Poteran Island, Madura Indonesia. **Proceeding Of 9th International Conference On Marine Technology (Martec)**. Surabaya, 24-26 Oktober 2014. Surabaya: Its Press

Bohm, H dan Mack G . 2004. Betaxanthin Formation And Free Amino Acids In Hairy Roots Of *Beta Vulgaris* Var. Lutea Depending On Nutrient Medium And Glutamate Feeding. **Phytochem** 65: 1361–1368.

Chakravarthy. 2012. **Cell Suspension Culture**. <[Http://Www.Kluniversity.In/](http://www.kluniversity.in/)> [1 November 2014].

Coppin, J. 2012. **A Study Of The Nutritional And Medicinal Values Of *Moringa oleifera* Leaves From Sub-Saharan Africa: Ghana, Rwanda Senegal And Zambia**. Graduate School-New Brunswick Rutgers, The State University Of New Jersey.

Cunnif, P., 1996. **Official Method Of Analysis Of AOAC International Sixteenth Edition Vol II**, Published By AOAC International Suite 500, 481 North Freederick Avenue Gaithersburg: Maryland 20877-2417 USA

Davey M.R., Anthony P, Power J.B., dan Lowe K.C. 2005. Plant Protoplasts: Status And Biotechnological Perspectives. **Biotechnol Adv**, 23:131-171.

Dewitt W, and Murray J.A.H. 2003. The Plant Cell Cycle. **Annu Rev Plant Biol**, 54:235-64.

Dong, J., G. Wan, dan Z. Liang. 2010. Accumulation Of Salicylic Acid Induced Phenolic Compounds And Raised Activities Of Secondary Metabolic And Antioxydative Enzymes In *Salvia miltiorrhiza* Cell Culture. **Journal Of Biotechnology** 148: 99-104

Dwimahyani, I. Metode Suspensi Sel untuk Membentuk Spot Hijau pada Kultur In Vitro Galur Mutan Tanaman Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L.). **Jurnal Ilmiah Aplikasi Isotop dan Radiasi**. 3 (2) ; 55-79.

Dykes L. dan Rooney L.W. 2007. Phenolic Compounds In Cereal Grains And Their Health Benefits. **Cereal Foods World** 52:105–111.

Evans, D.E., J.O.D. Coleman dan A. Kearns. 2003. **Plant cell culture**. London: Bios scientific publisher.

Fowler, M. W., dan Graham S. W. 1992. **Plant Biotechnology: Comprehensive Biotechnology Second Supplement**. England: Pergamont Press.

Gelli, A., V. J. Higgins, dan E. Blumwald. 1997. Activation of Plant Plasma Membrane Ca²⁺ Permeable Channels by Race-Specific Fungal Elicitors. **Plant Physiol** 113: 269-279.

Guerrero, R.F, Garcia-Parrilla M.C., Puertas B, dan Cantos-Villar E . 2009. Wine, Resveratrol And Health: A Review. **Nat. Prod. Commun.** 4(5): 635-58.

Handa, S.S., Suman P.S.K., Gennaro L., dan Dev D.R. 2008. **Extraction Technologies For Medicinal And Aromatic Plants.** International Centre For Science And High Technology.

Hara, M., J. Furukawa, A. Sato,T. Mizoguchi, dan K. Miura. 2012. Abiotic Stress and Role of Salicylic Acid in Plants. P. **Ahmad dan M.N.V. Prasad (eds.) Abiotic Stress Responses in Plants: Metabolism, Productivity and Sustainability.** Springer Science Business Media.

Hardiana, R., Rudyansyah, dan T. A. Zaharah. 2012. Aktivitas Antioksidan Senyawa Golongan Fenol Dari Beberapa Jenis Tumbuhan Famili Malvaceae. **JKK** 1 (1): 8-13

Hernani dan O. Rostiana. 2004. Analisis Kimia Akar Purwoceng (*Pimpinella pruatjan*). **Prosiding Fasilitasi Forum Kerjasama pengembangan Biofarmaka.** Dirjen Tanaman Sayuran dan Biofarmaka, Deptan : 212-225.

Hernani, Tri Marwati, dan Christina Winarti. 2007. Pemilihan Pelarut Pada Pemurnian Ekstrak Lengkuas (*Alpinia galanga*) Secara Ekstraksi. **J.Pascapanen** 4: 1-8

Iqbal, S., dan M.I. Bhanger. Effect Of Season And Production Location On Antioxidant Activity Of *Moringa Oleifera* Leaves Grown In Pakistan. **J. Of Food Comp. And Anal.** 19:544-551.

Jadhav, A.P., J.A. Kareparamban, P.H. Nikam dan V.J. Kadam. 2012. Spectrophotometric Estimation Of Ferilic Acid From

Ferula asafoetida By Folin- Ciocalteu Reagent. **Der Pharmacia Sinica** 3 (6): 680:684

Jaganath, I.B. dan Alan Crozier. 2010. **Plant Phenolics and Human Health: Biochemistry, Nutritive, and Pharmacology**. John Wiley and Sons Inc.

Kovačič^a, J., I. Kron, M. Repčák dan M. Bac̣kor. 2007. Effect of feeding precursors on phenylalanine ammonia-lyase activity and coumarin accumulation in leaves of *Matricaria chamomilla* L. **Plant Growth Regul** 52:9–15

Kovačič^b J, Klejdus B, Bac̣kor M, dan Repčák M .2007. Phenylalanine ammonia-lyase activity and phenolic compounds accumulation in nitrogen-deficient *Matricaria chamomilla* leaf rosettes. **Plant Sci** 172:393–399.

Krisnadi, A.D. 2012. **Kelor Super Nutrisi**. Blora: Kelorina.Com.

Lalida P.S. 2013. Peroxidase Activity In Native And Callus Culture Of *Moringa Oleifera* Lam. **Journal Of Medical And Bioengineering** 2(3).

Luthfiyah, F. 2012. Potensi Gizi Daun *Moringa Oleifera* (*Moringa Oleifera*) Nusa Tenggara Barat. **Media Bina Ilmiah**, 6 (2): 42-50.

Maldini, M., Salwa A.M., Fausta N., Paola M., Giacomo L.P., Marzia F., Gina R. De Nicola, Mario C., dan Giorgio P. 2014. *Moringa Oleifera*: Study Of Phenolics And Glucosinolates By Mass Spectrofotometry. **J. Mass Spectrom.**, 49: 900-910.

Masoumian, M., A. Arbakariya, A. Syahda, dan M. Maziah. 2011. Effect Of Precursors On Flavonoid Production By *Hydrocotyle bonariensis* Callus Tissues. **African Journal Of Biotechnology** 10 (32) :6021-6029.

Mathur, M dan R. Kamal. 2012. Studies On Trigonelline From *Moringa Oleifera* And Its In Vitro Regulation By Feeding Precursor In Cell Cultures. **Journal Of Pharmacognosy** 22(5): 994-1001.

Maulidina, D., dan N. Zulkarnaen. 2010. Ekstraksi Antioksidan (Likopen) Dari Buah Tomat Dengan Menggunakan Solven Campuran N - Heksana, Aseton, Dan Etanol. **Skripsi**. Semarang : Jurusan Teknik Kimia Fakultas Teknik Universitas Diponegoro.

Memelink, J., R. Verpoorte, dan J.W. Kijne. 2001. O.R.C. Anization of jasmonate-responsive gene expression in alkaloid metabolism. **Trends Plant Sci** 6: 212–219 (2001).

Munk Dan Riley (1952) *dalam* Friabele, E.S., D.L Correl, Dan M.A Faust. 1978. Relationship Between Phytoplankton Cell Size And The Rate Of Orthophosphate Uptake: Insituobservation Of An Estuarina Population. **Marine Biology** 45: 39-52

Mylene C. N. dan Evalour T. A. 2011. Callus Induction In Cotyledons Of *Moringa Oleifera* Lam. **Philipp Agric Scientist** 94(3): 239-247.

Namdeo, A.G. 2007. Plant Cell Elicitation for Production of Secondary Metabolitesevans. **Pharmacognosy Reviews**. 1 (1).

Patel, H., dan R. Krishnamurthy. 2013. Elicitors In Plant Tissue Culture. **Journal Of Pharmacognosy And Phytochemistry**, 2 (2).

Peterson, G. dan R. Smith. 1991. Effect Of Abscid Acid And Callus Size On Regeneration Of American And International Rice Varieties. **Plant Cell Rep** 10: 35- 38

Pierik, R.I. 1987. In vitro Culture oF Higher Plants. Martinus Martinus Nijhoff Publishers: Netherlands

Puspitasari, A., dan C, J, Soegihardjo. 2002. Optimisasi Media Pertumbuhan Kalus Sebagai Langkah Awal Upaya Budidaya In Vitro Tanaman *Vitex trifolia* L. **Majalah Farmasi Indonesia** 13 (1), 21-25.

Rahimi, S., Tahereh H., Far Zaneh N., dan Ramezan A. K. 2011. Enhancement Of Silymarin Accumulation Using Precursor Feeding In *Silybum marianum* Hairy Root Cultures. **Plant Omics Journal**, 4(1):34-39.

Rao S.R., dan Ravishankar G.A. 2002. Plant Cell Cultures: Chemical Factories Of secondary Metabolites. **Biotechnol Adv**, 20:101-153.

Raskin I, Ribnicky D.M., Komarnytsky S., Ilic N., Poulev A., Borisjuk N., Brinker A., Moreno Da, Ripoll C., Yakoby N., O'neal J.M., Cornwell T., Pastor I., dan Fridlender B. 2002. Plants And Human Health In The Twenty-First Century. **Trends Biotechnol.**, 20(12): 522-531.

Riedel, H., Divine N. A., Nay M.M.T.S., Onur K., Peter N., dan Iryna S. 2012. Elicitation And Precursor Feeding Influence

Fenolic Acids Composition In *Vitis vinifera* Suspension Culture. **African Journal Of Biotechnology** 1(12):3000-3008.

Roloff, A., H. Weisgerber, U. Lang, dan B. Stimm. 2009. **Enzyklopädie Der Holzgewächse, Handbuch Und Atlas Der Dendrologie**. Weinheim : Wiley-Vch Verlag Gmbh & Co. Kga.,

Romeis, T. 2001. Protein kinases in the plant defense response. **Curr Opin Plant Biol** 4:407-414.

Roy, D., dan S. Mukhodhyay. 2012. Enhances Rosminic Acid Production In Cultured Plants Of Two Species Of Mentha. **Indian Journal Of Experimental Biology**, 50: 817-825

Sae-Lee, N., O. Kerdchoechuen, dan N. Laohakunjit. 2011. Effects Of Ammonium Nitrate On Cell Growth And Production Of Fenolic Compounds In Cell Suspension Cultures Of *Vitis vinifera*. **Agricultural Sci. J.** 42(2)(Suppl.): 249-252

Santos-Buelga C., dan A. Scalbert. 2000. Proanthocyanidins And Tannin-Like Compounds Nature, Occurrence, Dietary Intake And Effects On Nutrition And Health. **J. Sci. Food Agric**, 80: 1094-1117.

Sharma, M., A. Sharma, A. Kumar dan S. K. Basu. 2011. Enhancement Of Secondary Metabolites In Culture Plant Cells Through Stress Stimulus. **American Journal Of Plant Physiology** 6:50-71

Shinde A.N., Malpathak N., dan Fulzele D.P. 2009. Enhanced Production Of Phytoestrogenic Isoflavones From Hairy Root

Cultures Of *Psoralea Corylifolia* L. Using Elicitation And Precursor Feeding. **Biotechnol. Bioprocess Eng.** 14: 288-294.

Signorelli, P., dan R. Ghidoni. 2005. Resveratrol As An Anticancer Nutrient: Molecular Basis, Open Questions And Promises. **Journal Of Nutritional Biochemistry** 16: 449-466

Skoog, F., dan Miller, C.O. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. **Symp. Soc. Exp. Biol.** 11: 118-130.

Smetanska, I . 2008. Production Of Secondary Metabolites Using Plant Cell Cultures. **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.** 111: 187-228.

Soleas, G. J., E. P. Diamandis dan D. M. Goldberg. 2000. **The World Of Resveratrol. Nutrien And Cancer Prevention.** New York.

Sreelatha, S dan P. R. Padma. 2009. Antioxidant Activity And Total Phenolic Content Of *Moringa oleifera* Leaves In Two Stages Of Maturity. **Plant Foods Hum Nutr** 64:303-311.

Sri K., Masdiana P., Suprayogi, dan Vitta R.P. 2011. Encapsulation Of *Lactobacillus* Sp. With *Moringa oleifera* Leaves Extract For Food Supplement. **International Research Journal Of Agricultural Science And Soil Science** 1(7): 273-277.

Susanti, A. D., D. Ardiana, Gita G.P, dan Yosephin B.G. 2012. Polaritas Pelarut Sebagai Pertimbangan Dalam Pemilihan Pelarut Untuk Ekstraksi Minyak Bekatul Dari Bekatul Varietas Ketan

(*Oryza sativa glatinosa*). **Simposium Nasional Rapi Xi Ft Ums** 2012: 8-10

Sze, H., X. Li dan M. G. Palmgren. 1999. Energization of Plant Cell Membranes by H⁺-Pumping ATPases: Regulation and Biosynthesis. **The Plant Cell** 11: 677–689

Tissurat B. dan Berhow M. 2003. **Carbon Levels Influence Rosmarinic Acid Levels In Tissue Cultures Of *Mentha spicata* L.** Phytochemical Society Of North America Meeting And Newsletter

USDA, NRCS. 2015. **The PLANTS Database**. National Plant Data Team, Greensboro, NC 27401 - 4901 USA. <<http://plants.usda.gov>> [9 February 2015].

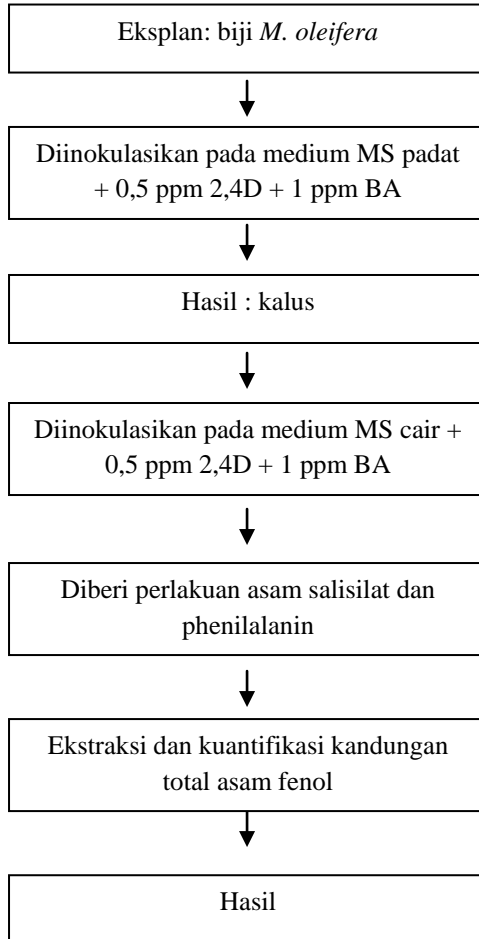
Vuong, T.V., C. Francoa, dan W. Zhang. 2014. Treatment Strategies For High Resveratrol Induction In *Vitis vinifera* Cell Suspension Culture. **Biotechnology Reports** 1(2) :15–21

War, A.R., M.G. Paulraj, M. Y. War dan S. Ignacimuthu. 2011. Role Of Salicylic Acid In Induction Of Plant Defense System In Chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Plant Signaling And Behavior** 6 (11) : 1787- 1792

Zhao, J., L.C. Davis dan R. Verpoorte. 2005. Elicitor Signal Transduction Leading To Production Of Plant Secondary Metabolites. **Biotechnol. Adv.** 23: 283-333.

LAMPIRAN

Lampiran 1 : Diagram Alir Metode Penelitian



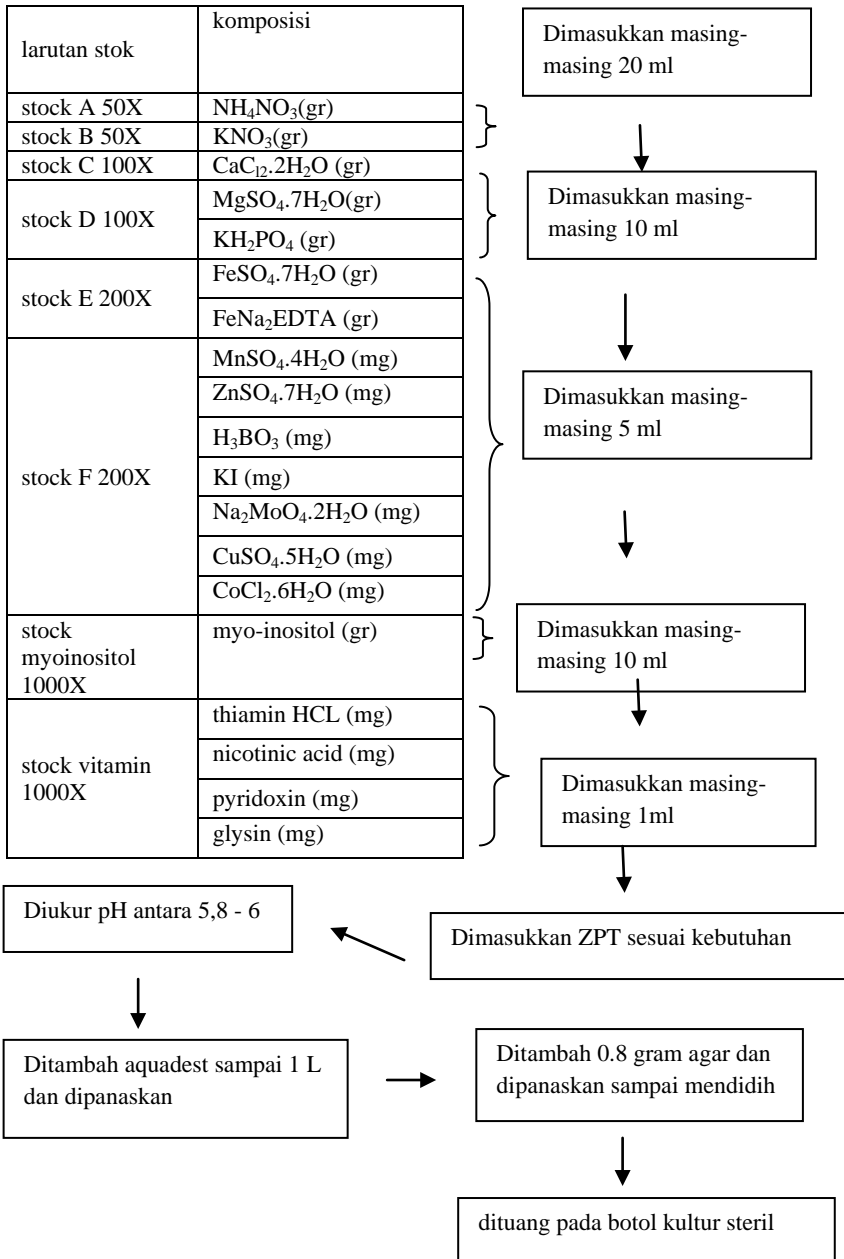
Lampiran 2: Komposisi media dasar MS (*Murashige and Skoog*)

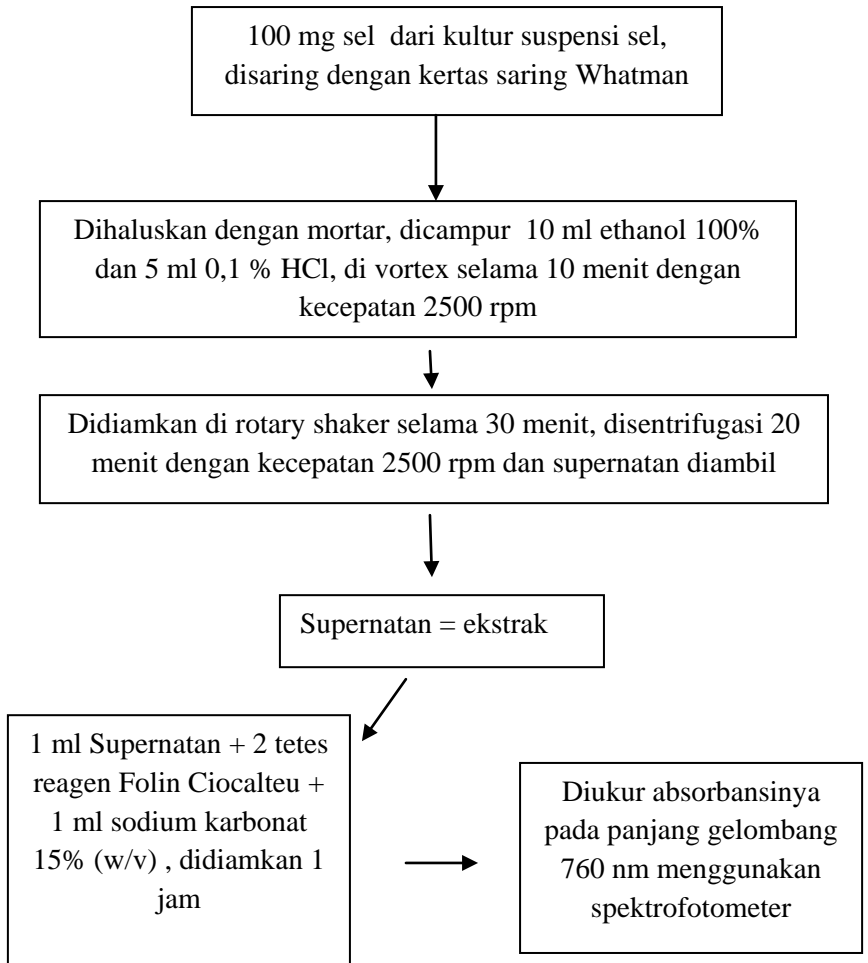
komposisi media dasar mg/L	
NH_4NO_3	1650
KNO_3	1900
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
KH_2PO_4	170
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8
FeNa_2EDTA / FeEDTA	37,3
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,3
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,6
H_3BO_3	6,2
KI	0,83
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025
Myo -inositol	100
Thiamin HCL	0,1
Nicotinic acid	0,5
Pyridoxin	0,5
Glysin	2
Glukosa	30 gram

Lampiran 3: Komposisi larutan stok media MS (*Murashige and Skoog*)

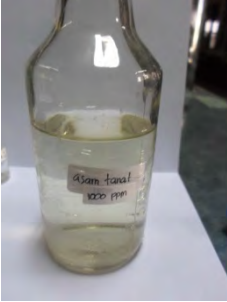



larutan stok	Komposisi	500mL	250mL	100 mL
stock A 50X	NH ₄ NO ₃ (gr)	41,75	20,875	
stock B 50X	KNO ₃ (gr)	47,5	23,75	
stock C 100X	CaCl ₂ .2H ₂ O (gr)	22	11	
stock D 100X	MgSO ₄ .7H ₂ O(gr)	18,5	9,25	
	KH ₂ PO ₄ (gr)	8,5	4,25	
stock E 200X	FeSO ₄ .7H ₂ O (gr)	2,785	1,3925	
	FeNa ₂ EDTA (gr)	3,725	1,8625	
stock F 200X	MnSO ₄ .4H ₂ O (mg)	1690	845	
	ZnSO ₄ .7H ₂ O (mg)	860	430	
	H ₃ BO ₃ (mg)	620	310	
	KI (mg)	83	41,5	
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O (mg)	25	12,5	
	CuSO ₄ .5H ₂ O (mg)	2,5	1,25	
	CoCl ₂ .6H ₂ O (mg)	2,5	1,25	
stock myoinositol 1000X	myo-inositol (gr)	5	2,5	
stock vitamin 1000X	thiamin HCL (mg)			10
	nicotinic acid (mg)			50
	pyridoxin (mg)			50
	glysin (mg)			200

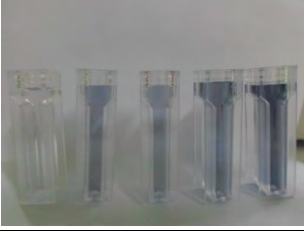

Lampiran 4: Skema pembuatan media dasar MS (*Murashige and Skoog*)




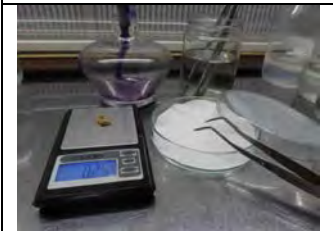
Lampiran 5: Skema kerja ekstraksi asam fenol

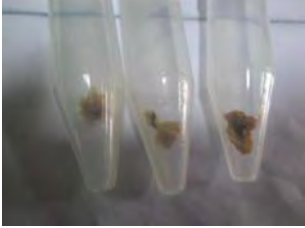




Lampiran 6 pembuatan standart asam tanat

Foto perlakuan	Keterangan
	Asam tanat 100 mg dilarutkan dengan aquades 100 ml sehingga konsentrasi asam tanat 1000 ppm
	Asam tanat diencerkan sampai konsentrasi 0,2 – 1 ppm
	Penambahan reagen folin ciocalteu
	Penambahan sodium karbonat 15 %

	<p>setelah ditunggu selama 1 jam, asam tanat dimasukkan dalam kuvet sebanyak 2 ml</p>
	<p>Diabsorbansi pada panjang gelombang 760 nm</p>

Lampiran 7 Ekstraksi total asam fenol

Foto perlakuan	Keterangan
	<p>Kultur suspensi sel <i>M. oleifera</i> disaring</p>
	<p>Kalus yang tertinggal di kertas saring ditimbang dengan neraca digital steril</p>

	<p>Kalus dimasukkan di tabung sentrifuse</p>
	<p>Kalus dihaluskan dengan menggunakan mortar</p>
	<p>Kalus yang sudah halus ditambah dengan HCL 0,1 % 5 ml dan etanol 100% sampai 14 ml</p>
	<p>Suspensi sel dan pelarut di tuang pada tabung sentrifuse</p>
	<p>Divorteks selama 10 menit dengan kecepatan 2500 rpm</p>

	<p>Di rotary shaker selama 30 menit untuk proses maserasi</p>
	<p>Disentrifuse selama 20 menit dengan kecepatan 2500 rpm</p>
	<p>Disaring supernatan dengan kertas Whatman no 42</p>
	<p>Hasil ekstrak total asam fenol</p>

Lampiran 8 Estimasi total asam fenol menggunakan spektrofotometer

Foto perlakuan	keterangan
	Ekstrak total fenol
	Dimasukkan dalam tabung reaksi 1 ml
	Ditambah 2 tetes reagen Folin Ciocalteu dan di vorteks 1 menit kecepatan 2500 rpm
	Dirotary shaker selama 7 menit

	<p>Ditambah 2 ml sodium karbonat 20%</p>
	<p>Ditunggu selama 1 jam</p>
	<p>Dimasukkan kuvet sebanyak 2 ml</p>
	<p>Diabsorbansi pada panjang gelombang 760 nm dan dihitung konsentrasinya dengan $Y = 4,091x - 0,001$</p>

Lampiran 9. Data absorbansi dan konsentrasi ekstrak asam fenol perlakuan asam salisilat

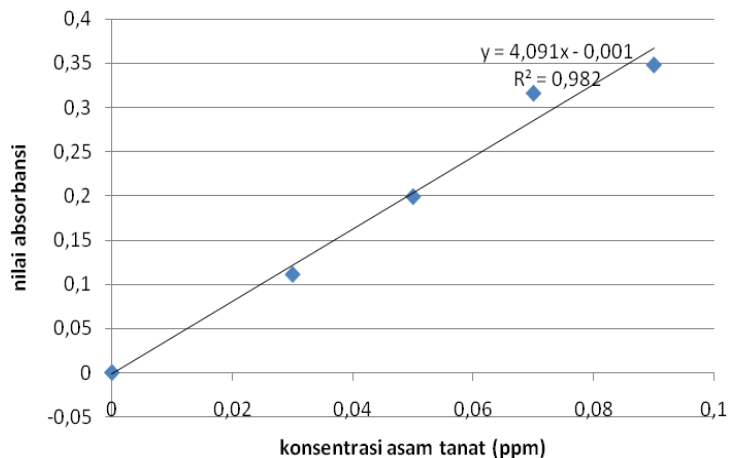
Konsentrasi	Ulangan	Nilai absorbansi	Konsentrasi ($y=4,091x-0,001$)
0	1	0,161	0,657651
	2	0,136	0,555376
	3	0,166	0,678106

0,5	1	0,465	1,901315
	2	0,216	0,882656
	3	0,318	1,299938
1	1	0,295	1,205845
	2	0,57	2,33087
	3	0,314	1,283574
1,5	1	0,275	1,124025
	2	0,339	1,385849
	3	0,296	1,209936

Lampiran 10 Anova one way total asam fenol perlakuan asam salisilat

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.552	3	.517	3.046	.092
Within Groups	1.358	8	.170		
Total	2.910	11			

Lampiran 11 Kurva standar asam tanat



Lampiran 12. Data absorbansi dan konsentrasi ekstrak asam fenol perlakuan fenilalanin

konsentrasi	ulangan	Nilai absorbansi	Konsentrasi ($y=4,091x-0,001$)
0	1	0,161	0,657651
	2	0,136	0,555376
	3	0,166	0,678106
5	1	0,286	1,169026
	2	0,409	1,672219
	3	0,479	1,958589
10	1	0,383	1,565853
	2	0,296	1,209936
	3	0,246	1,005386
15	1	0,312	1,275392
	2	0,432	1,766312
	3	0,371	1,516761

Lampiran 13. Anova one way total asam fenol perlakuan fenilalanin

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.737	3	.579	7.600	.010
Within Groups	.610	8	.076		
Total	2.347	11			

Lampiran 14. Uji Tukey konsentrasi asam fenol perlakuan fenilalanin

perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
1.00	3	.6304	
3.00	3	1.2604	1.2604
4.00	3		1.5195
2.00	3		1.5999
Sig.		.089	.477

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

Lampiran 15. Data berat kering sel perlakuan fenilalanin

Konsentrasi	Ulangan	Berat kering (mg)
0	1	7,22
	2	8,58
	3	4,80
5	1	7,54
	2	8,30
	3	6,10
10	1	6,00
	2	9,00
	3	8,30
15	1	17,10
	2	6,50
	3	5,50

Lampiran 16 data berat kering sel perlakuan asam salisilat

Konsentrasi	Ulangan	Berat kering (mg)
0	1	36,1
	2	34,3
	3	4,8
0,5	1	11,8
	2	6,9
	3	11,3
1	1	7,9
	2	24,3
	3	5,3
1,5	1	13,9
	2	5,8
	3	3,5

“Halaman Ini Sengaja Dikosongkan”

BIODATA PENULIS



Penulis lahir di Sidoarjo, 18 Juni 1993. Memulai pendidikan dasar di MI. Bahrul Ulum Sawo Dungus Sukodono Sidoarjo. Ketertarikan penulis mengenai ilmu alam mulai terlihat pada jenjang sekolah dasar ini. Setelah lulus SD, ia melanjutkan ke jenjang menengah pertama di SMP Negeri 2 Taman Sidoarjo. Setelah lulus SMP, ia melanjutkan ke jenjang menengah atas di SMA Negeri 1 Taman Sidoarjo. Disini, pengetahuannya mengenai dunia biologi semakin terlihat, bakat dan ketertarikannya pada dunia biologi semakin terasah sehingga penulis mengambil jurusan IPA. Pada jenjang ini, penulis aktif dalam kegiatan keilmiah.

Setelah lulus SMA, penulis melanjutkan ke jenjang perguruan tinggi di Jurusan Biologi FMIPA Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS) Surabaya. Bidang biologi yang diminati penulis ialah botani. Pada jenjang ini, penulis juga aktif dalam kegiatan organisasi keislaman, yaitu Forum Kajian Islam Qur'ani (FKIQ) Biologi ITS. Selain itu, penulis aktif mengikuti berbagai pelatihan, seminar, kepanitiaan dan pengabdian masyarakat, diantaranya Latihan Keterampilan Manajemen Mahasiswa (LKMM), *Character Building Seminar*, kepanitiaan IBOC (*International Biology conference*), serta peserta dari SIDI (*Sustainable Island Development Initiative*) Poteran, Madura.