

Green Technology / Teknologi Proses

LAPORAN AKHIR
PENELITIAN KOMPETITIF
Penelitian Dasar



Produksi Pigmen Hijau
dalam Kultur Suspensi Sel *Sauropus androgynus*

Dr. Oeke Yunita, S.Si., M.Si., Apt.
(NPK. 207011, NIDN. 0728067304)

UNIVERSITAS SURABAYA
Maret, 2015

HALAMAN PENGESAHAN

Judul Penelitian : **Produksi Pigmen Hijau dalam Kultur Suspensi Sel**
Sauropus androgynus

Nama Rumpun Ilmu : Farmasi

Ketua Peneliti

a. Nama Lengkap : Dr. Oeke Yunita, S.Si., M.Si, Apt.
b. NPK/NIDN : 207011 / 0728067304
c. Jabatan Fungsional : LEKTOR, III-c
d. Fakultas/ Program Studi : Farmasi
e. HP : 081-216945749
f. Alamat e-mail : oeke@staff.ubaya.ac.id

Anggota Peneliti (1)

a. Nama Lengkap : -
b. NPK/NIDN : -
c. Fakultas/ Program Studi : -

Anggota Peneliti (2)

a. Nama Lengkap : -
b. NPK/NIDN : -
c. Fakultas/ Program Studi : -

Lama Penelitian Keseluruhan : 2 tahun
Penelitian Tahun ke- : 1 dari 2 tahun
Biaya : Rp. 15.000.000,-

Surabaya, 17 Maret 2015

Menyetujui,
Pimpinan Unit Kerja,

Ketua Peneliti,

Dra. Nani Parfati, M.S., Apt.
NPK. 182009

Dr. Oeke Yunita, S.Si., M.Si., Apt.
NPK. 207011

RINGKASAN

Daun katuk (*Sauropus androgynus*) terkenal di masyarakat sebagai pewarna pangan karena memiliki kandungan klorofil yang tinggi dibandingkan tanaman lain. Daun katuk tidak hanya bermanfaat dalam bidang pangan, tapi juga dalam bidang medis karena klorofil yang terkandung di dalamnya dapat digunakan sebagai antioksidan dan anti kanker.

Kultur suspensi sel katuk yang diinduksi menggunakan medium cair *Murashige and Skoog* (MS) disuplementasi dengan asam -naftalen asetat (NAA) 1 ppm, dan 6-benzil adenine 0,5 ppm, mampu menghasilkan kultur suspensi sel yang berwarna hijau.

Penelitian ini telah menganalisis profil spektrum dan kromatogram pigmen hijau dalam massa kultur suspensi sel katuk (*Sauropus androgynus*). Metode ekstraksi pigmen hijau yang digunakan adalah metode ultrasonikasi dengan solven metanol.

Profil spektrum dari massa kultur suspensi menunjukkan adanya dua senyawa yaitu pigmen X pada λ_{max} 602,8-607,1 nm dengan absorbansi 0,0359187 dan pigmen Y pada λ_{max} 662,5-664,7 nm dengan absorbansi 0,0873668. Analisis massa kultur suspensi sel katuk dengan metode kromatografi lapis tipis (KLT) menunjukkan dua noda, yaitu pigmen X yang berwarna hijau kekuningan ($R_f = 0,338$) dan pigmen Y yang berwarna hijau kebiruan ($R_f = 0,375$) setelah enam hari kultivasi. Profil spektrum dan kromatogram pigmen X dan Y dalam massa kultur suspensi sel katuk serupa dengan daun katuk.

PRAKATA

Puji syukur ke hadiratNya atas kasih karunia dan berkat yang diberikan sehingga penelitian yang berjudul **Produksi Pigmen Hijau dalam Kultur Suspensi Sel *Sauropus androgynus*** dapat terselesaikan tepat pada waktunya.

Penelitian ini dapat terselesaikan dengan adanya bantuan dari berbagai pihak, oleh karena itu peneliti mengucapkan terima kasih yang sebesar – besarnya kepada semua pihak yang telah memfasilitasi pelaksanaan penelitian ini.

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi dasar untuk pengembangan lebih lanjut dalam teknologi bioproses khususnya untuk produksi pigmen hijau yang dapat bermanfaat bagi industri makanan, minuman, obat, obat tradisional dan kosmetik.

Surabaya, 17 Maret 2015

Peneliti

DAFTAR ISI

Halaman Sampul	i
Halaman Pengesahan	ii
Ringkasan	iii
Prakata	iv
Daftar Isi	v
Daftar Tabel	vi
Daftar Gambar	vii
Daftar Lampiran	viii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	4
BAB 3 METODE PENELITIAN	8
3.1 Pembuatan Kultur Suspensi Sel Katuk	10
3.2 Pengamatan Identitas Kultur Suspensi Sel Katuk	10
3.3 Pengamatan Profil Pertumbuhan Kultur Suspensi Sel Katuk	11
3.3.1 Pengamatan terhadap % Packed Cell Volume (% PCV)	11
3.3.2 Pengamatan terhadap Indeks Pertumbuhan (IP)	11
3.4 Pengamatan Profil Pigmen dalam Kultur Suspensi Sel Katuk	11
3.5 Alur Penelitian	12
BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN	14
4.1 Hasil Induksi Kultur Suspensi Sel Katuk	14
4.2 Hasil Pengamatan Identitas Kultur Suspensi Sel Katuk	15
4.3 Hasil Pengamatan Profil Pertumbuhan Kultur Suspensi Sel Katuk	19
4.3.1 Pengamatan terhadap % Packed Cell Volume (% PCV)	19
4.3.2 Pengamatan terhadap Indeks Pertumbuhan (IP)	22
4.4 Hasil Pengamatan Profil Pigmen dalam Kultur Suspensi Sel Katuk	23
BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN	30
DAFTAR PUSTAKA	31
Lampiran 1. Instrumen	34
Lampiran 2. Personalia Tenaga Peneliti	37

DAFTAR TABEL

2.1 Peta Jalan Penelitian Produksi Pigmen Hijau melalui Kultur Katuk, sesuai dengan RIP Ubaya	6
4.1 Hasil Penimbangan Kultur Kalus Daun Katuk	14
4.2 Hasil Pengukuran Kualitas dan Kuantitas DNA Daun dan Kultur Suspensi Sel Katuk	17
4.3 Hasil Pengukuran % PCV Kultur Suspensi Sel Katuk Hari ke-1, 3, 4	20
4.4 Hasil Pengukuran % PCV Kultur Suspensi Sel Katuk Hari ke-6	21
4.5 Harga IP Kultur Suspensi Sel Daun Katuk	22
4.6 Hasil Analisis Pigmen Hijau Daun dan Massa Kultur Suspensi Katuk dengan Spektrofotometer	26

DAFTAR GAMBAR

2.1	Katuk (<i>Sauropus androgynus</i> , Euphorbiace)	4
2.2	Kurva indeks pertumbuhan kalus terhadap waktu pada media NAA ₁ -BA _{0,5}	7
3.1	Bagan alir penelitian untuk produksi pigmen hijau dalam kultur katuk (<i>Sauropus androgynus</i>)	9
3.2.	Alur penelitian produksi pigmen hijau dalam kultur suspensi sel katuk	13
4.1	Hasil pengamatan waktu subkultur kultur suspensi sel pasasi ke-1 pada hari ke-0 dan hari ke-6	15
4.2	Hasil sampling massa kultur suspensi sel katuk pasasi ke-5, (a) S ₁ (b) S ₃ (c) S ₄ (d) S ₆	15
4.3	Pengamatan mikroskopis kultur suspensi sel katuk	16
4.4	Hasil elektroforesis dengan primer OPD-11 daun katuk (a), dan kultur suspensi sel katuk (b)	18
4.5	Grafik % PCV kultur suspensi sel katuk (n=3)	21
4.6	Grafik harga IP kultur suspensi sel katuk (n=3)	23
4.7	Perbandingan profil pigmen hijau daun dan massa kultur suspensi sel katuk	24
4.8	Hasil eluasi ekstrak (a) daun katuk (Rf Y = 0,425, Rf X = 0,363), (b) S ₁ (c) S ₃ (d) S ₄ (e) S ₆ yang dilihat dengan sinar tampak	27
4.9	Hasil eluasi ekstrak daun dan kultur suspensi dilihat dengan menggunakan sinar UV 254 nm, (a) daun katuk (Rf Y = 0,425, Rf X = 0,363) (b) S ₁ (c) S ₃ (d) S ₄ (e) S ₆	28
4.10	Hasil eluasi ekstrak daun dan kultur suspensi dilihat dengan menggunakan sinar UV 366 nm, (a) daun (Rf Y = 0,425, Rf X = 0,363); (b) S ₁ (Rf Y = 0,388, Rf X = 0,350); (c) S ₃ (Rf X = 0,313); (d) S ₄ (Rf X = 0,350); (e) S ₆ (Rf Y = 0,375, Rf X = 0,338)	28

DAFTAR LAMPIRAN

1. INSTRUMEN	34
2. PERSONALIA PENELITIAN	37

BAB 1

PENDAHULUAN

Kebutuhan akan pewarna alami semakin meningkat seiring dengan peningkatan kesadaran akan adanya efek samping pewarna sintetis mulai dari gejala alergi hingga kanker. Pewarna alami yang berasal dari tumbuhan juga memiliki keunggulan dengan adanya aktivitas terapeutik yang berguna untuk kesehatan. Pewarna alami dapat digunakan pada industri makanan, kosmetik dan farmasi (Chengaiyah *et al.*, 2010).

Salah satu tumbuhan yang sering digunakan sebagai pewarna alami adalah daun katuk (*Sauropus androgynus*) yang dapat digunakan sebagai pewarna hijau makanan, dalam bentuk tepung atau bubuk daun katuk, karena pewarna dari daun katuk tidak mempengaruhi sifat sensoris produk (Hardjanti, 2008; Herudiyanto, 2009).

Pada hasil penelitian sebelumnya, Yunita (2011) melaporkan bahwa ekstrak metanol katuk yang berwarna hijau pekat mengandung variasi metabolit karena adanya perbedaan sumber habitat sampel katuk, berdasarkan hasil analisis sidik jari metabolit dengan kromatografi gas detektor spektrometri massa (*Gas Chromatography-Mass spectrometry Detector / GC-MSD*) dan kromatografi cair kinerja tinggi (*High Performance Liquid Chromatography / HPLC*). Berdasarkan hasil penelitian Yunita dan Sulisetiorini (2013) analisis DNA pada sampel – sampel katuk tersebut menunjukkan adanya perbedaan profil genetik antar sampel yang diperoleh dari berbagai kondisi geografis yang berbeda.

Perbedaan profil genetik berbagai sampel katuk diantisipasi dengan penelitian selanjutnya oleh Yunita *et al.* (2013) yang melakukan inisiasi katuk dalam sistem kultur jaringan pada medium, yang disuplementasi dengan berbagai komposisi zat pengatur tumbuh, menjadi kultur kalus katuk yang tetap berwarna hijau. Hasil analisis Andrew (2014) menunjukkan adanya kemiripan profil pigmen hijau yang terkandung di dalam kultur kalus katuk dengan daun katuk.

Produksi pigmen dalam kultur jaringan tanaman telah dilakukan dalam berbagai penelitian misalnya karotenoid dalam kultur kalus *Centella asiatica* (Norhayati *et al.*, 2011), betalain dalam kultur kalus batang *Zaleya decandra* (Radfar *et al.*, 2012), antrakinon dalam kultur sel akar (Aobchey *et al.*, 2002), serta shikonin dalam kultur sel suspensi sel *Arnebia* sp. yang diproduksi melalui bioreaktor (Gupta *et al.*, 2013).

Berdasarkan hasil - hasil penelitian tersebut penelitian ini melakukan produksi pigmen hijau dalam kultur suspensi katuk, yang dibuat dengan cara transfer massa sel dari kultur kalus ke dalam medium cair menjadi kultur suspensi sel. Upaya ini merupakan langkah awal dalam teknologi bioproses pigmen hijau melalui kultur sel katuk.

Perumusan Masalah

Rumusan masalah penelitian ini adalah:

- a. Apakah kultur suspensi sel katuk (*Sauropus androgynus*) dapat memproduksi pigmen hijau?
- b. Bagaimana profil pigmen hijau yang diproduksi oleh kultur suspensi sel katuk (*Sauropus androgynus*)?

Tujuan Penelitian

Tujuan umum penelitian ini adalah untuk melakukan produksi pigmen hijau dalam kultur suspensi sel *Sauropus androgynus*.

Berdasarkan tujuan utama penelitian di atas, dapat diuraikan menjadi sub rumusan tujuan sebagai berikut

- a. Menginduksi kultur suspensi sel katuk (*Sauropus androgynus*) yang mampu memproduksi pigmen hijau
- b. Memperoleh profil pigmen hijau yang diproduksi oleh kultur suspensi sel katuk

Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah melalui publikasi pada jurnal mengenai kemampuan kultur suspensi sel *Sauropus androgynus* untuk memproduksi pigmen hijau. Selain itu penelitian ini dapat memberikan ketersediaan tanaman katuk untuk penelitian selanjutnya dalam skala produksi yang lebih besar. Penelitian ini juga dapat diaplikasikan pada industri suplemen herbal yang mengembangkan kultivasi katuk melalui sistem kultur jaringan tanaman.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

Katuk (*Sauropus androgynus*) (*Euphorbiaceae*), adalah tanaman perdu yang tumbuh di berbagai daerah di India, Malaysia, dan Indonesia. Tanaman ini tumbuh di dataran Indonesia dengan ketinggian 0-2100 m di atas permukaan laut. Tingginya mampu mencapai 2-3 m, dengan cabang yang agak lunak. Daun berwarna hijau sampai hijau kecoklatan, bertepi rata, dengan permukaan atas dan bawah yang rata dan tersusun berseling pada satu tangkai, berbentuk lonjong sampai bundar dengan panjang \pm 2,5 cm dan lebar 1,25-3 cm. Bunga tunggal atau berkelompok tiga. Buah bertangkai panjang 1,25 cm (Materia Medika V, 1980; Depkes RI, 2001; Rukmana dan Harahap, 2003). Foto tanaman ini dapat dilihat pada gambar 2.1.



Gambar 2.1 Katuk (*Sauropus androgynus*, Euphorbiace)
(Rukmana dan Harahap, 2011)

Menurut Hasanah (2005) katuk mempunyai beberapa varietas yaitu Paris, Bastar, Kebo dan Zanzibar, di mana salah satu varietas yang seringkali digunakan sebagai obyek penelitian adalah varietas Bastar (Sudiarto, 2002). Selain itu menurut Rukmana dan Harahap (2011), dua jenis katuk, yang banyak dijumpai di lapangan adalah katuk hijau dan katuk merah, di mana jenis katuk yang biasa dibudidayakan oleh masyarakat adalah katuk hijau.

Klasifikasi katuk menurut Depkes RI (2001) adalah sebagai berikut:

Divisi	: Spermatophyta
Anak Divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledonae
Bangsa	: Euphorbiales
Suku	: Euphorbiaceae
Marga	: <i>Sauropus</i>
Jenis	: <i>Sauropus androgynus</i> Merr.

Daun katuk berkhasiat untuk mengatasi demam, bisul, luka, darah kotor, memperbanyak air susu ibu, antioksidan, anti obesitas dan anti bakteri (Rahmat *et al.*, 2003; Bermawie, 2004; Azis dan Muktiningsih, 2006; Yu *et al.*, 2006; Benjapak *et al.*, 2008; Gothandam *et al.*, 2010; Paul dan Anto, 2011).

Katuk mengandung vitamin (β -carotene, α -carotene, vitamin C, vitamin E), fitosteroid, senyawa fenolik, quercetin dan kaempferol (Agil, 2000; Ching dan Mohamed, 2001; Mieran dan Mohamed, 2001; Sripanidkulchai *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2006; Benjapak *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008; Andarwulan *et al.*, 2010). Daun katuk juga dilaporkan mengandung alkaloid papaverin dalam jumlah yang cukup banyak yaitu 580 mg papaverin per 100g daun segar, yang diduga sebagai penyebab terjadinya berbagai efek samping yang berhubungan dengan saluran pernafasan (Azis dan Muktiningsih, 2006).

Sari daun katuk telah lama digunakan oleh masyarakat sebagai pewarna makanan, seperti pewarna tape ketan. Sari daun katuk didapatkan dengan cara mengekstraksi atau memeras daun katuk. Sari daun katuk yang didapat, digunakan sebagai pencampur beras ketan bahan tape. Pewarna alami dari sari daun katuk telah terbukti aman untuk digunakan sebagai pewarna makanan (Rukmana dan Harahap, 2011).

Penelitian ini merupakan kelanjutan dari penelitian sebelumnya dalam peta jalan (*roadmap*) penelitian pada skim *Green Technology* pada Rencana Induk Penelitian Universitas Surabaya (RIP Ubaya), terutama bidang Teknologi Bioproses, yang sudah diawali mulai tahun 2011, seperti pada tabel 2.1.

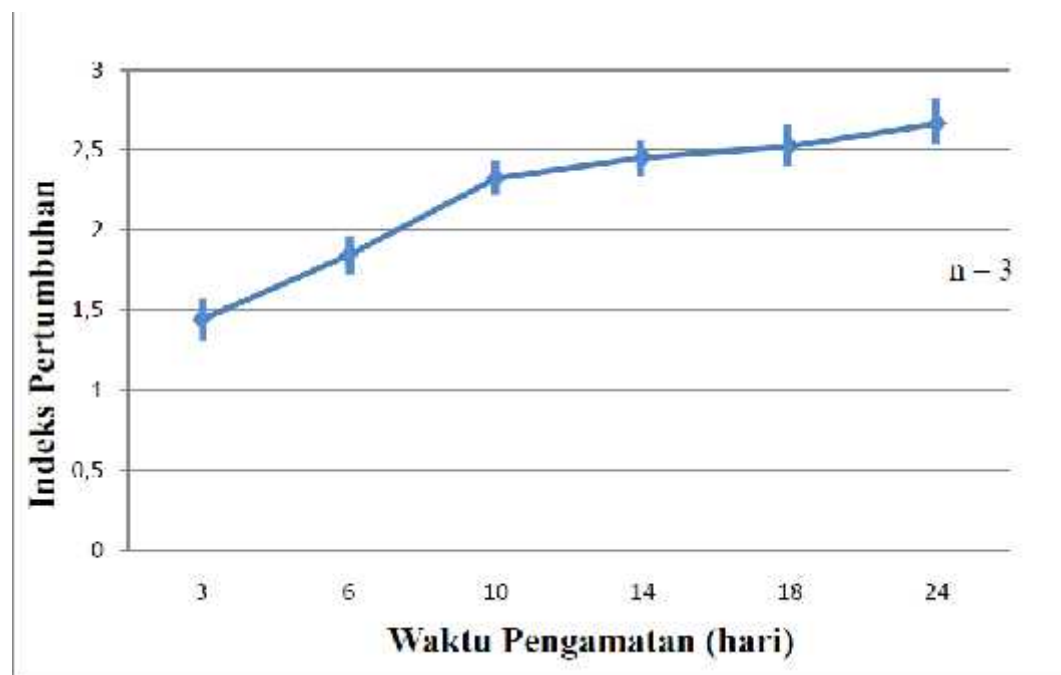
Tabel 2.1 Peta Jalan Penelitian Produksi Pigmen Hijau melalui Kultur Katuk, sesuai dengan RIP Ubaya

TAHAP	TAHUN				
	<2011	2012-2013	2014-2016	2017-2021	2022-2026
TAHAP	Analisis metabolomik dan genomik katuk	Inisiasi kultur jaringan (kalus) katuk	Peningkatan produksi pigmen hijau dan sekresi pigmen dalam medium	Peningkatan produksi pigmen spesifik dengan teknologi bioreaktor (<i>medium scale</i>)	Peningkatan produksi pigmen spesifik dengan teknologi bioreaktor (<i>large scale</i>)
HASIL	<i>Database</i> metabolit dan DNA katuk	Kultur kalus katuk dalam medium dengan berbagai komposisi hormon (2012/2013)	Analisis profil pigmen hijau dalam kalus katuk (2013/2014)	(belum dilakukan)	(belum dilakukan)
TAHAP PENELITIAN DASAR I (yang diusulkan)			Produksi pigmen hijau dalam kultur suspensi sel katuk (2014/2015)	(belum dilakukan)	
TAHAP PENELITIAN DASAR II			Peningkatan produksi pigmen dalam kultur suspensi katuk dan sekresi pigmen dalam medium (2015/2016)	(belum dilakukan)	

Hasil studi pendahuluan (*preliminary research*) menunjukkan keberhasilan inisiasi kultur kalus katuk yang berwarna hijau dalam medium Murashige dan Skoog (MS) yang disuplementasi dengan berbagai zat pengatur tumbuh. Hasil penelitian ini berupa kultur kalus katuk yang berwarna hijau dengan tekstur *friable* (remah) dengan profil pertumbuhan yang baik dalam medium MS yang

disuplementasi dengan hormon asam -naftalen asetat (-NAA) dan 6-benziladenin (BA), seperti pada Yunita *et al.* (2013).

Pada penelitian yang dilakukan Wigati (2013), menunjukkan pertumbuhan dan perkembangan morfologis kultur kalus katuk yang baik dalam medium MS yang disuplementasi dengan -NAA dan BA melalui pengamatan terhadap profil indeks pertumbuhan, seperti pada gambar 2.2.



Gambar 2.2 Kurva indeks pertumbuhan kalus terhadap waktu pada media NAA₁-BA_{0,5} (Wigati, 2013)

Hasil analisis Wigati (2013) terhadap profil DNA menunjukkan adanya kemiripan profil DNA dari kultur kalus katuk dibandingkan dengan profil DNA daun katuk, seperti pada profil DNA yang terdapat pada sampel penelitian Yunita dan Sulisetiorini (2013). Andrew (2014) juga menunjukkan adanya kemiripan profil pigmen hijau antara profil pigmen dalam kultur kalus dengan profil pigmen dalam daun utuh.

BAB 3

METODE PENELITIAN

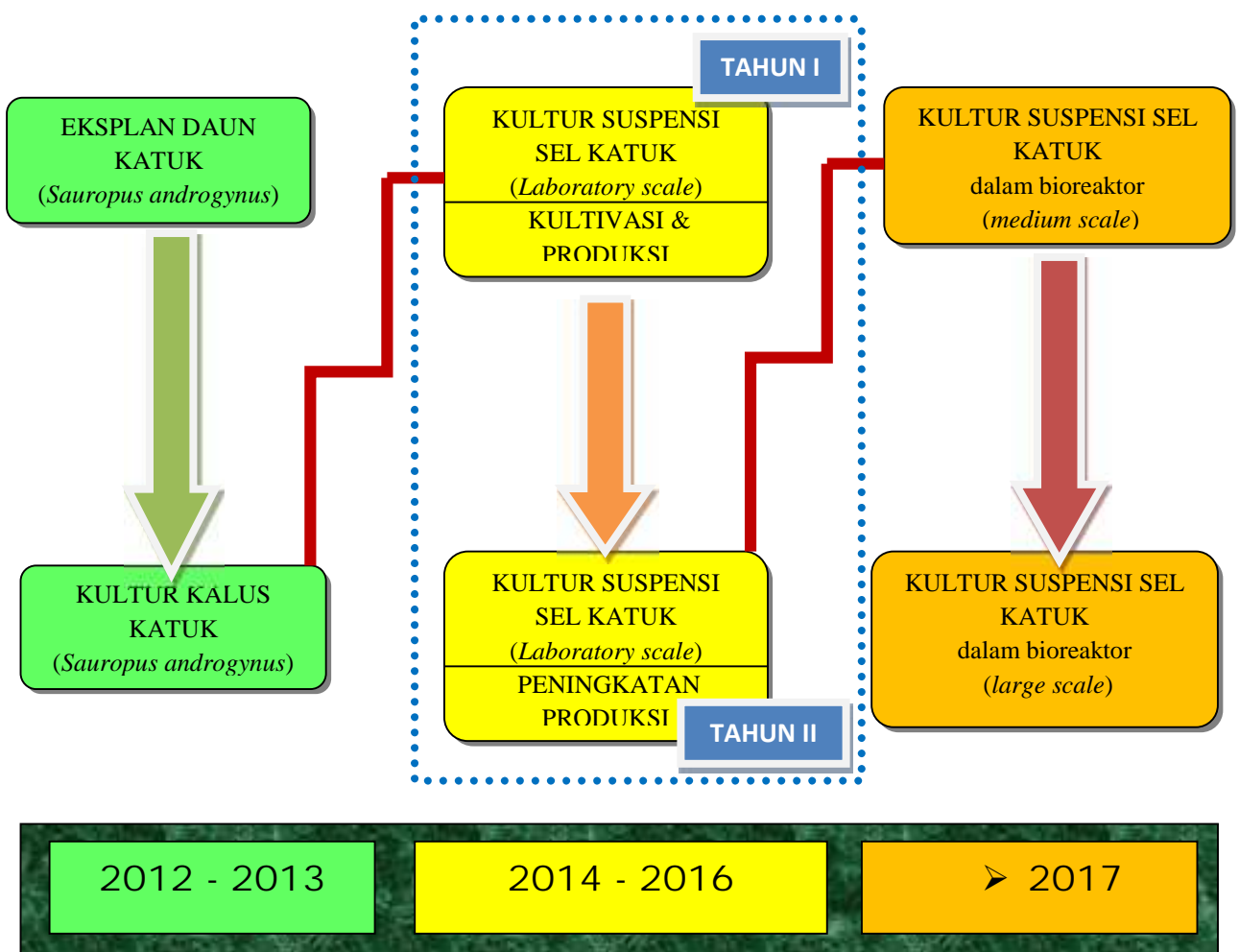
Penelitian ini merupakan kelanjutan dari penelitian sebelumnya sesuai dengan Rencana Induk Penelitian Universitas Surabaya (RIP UBAYA), pada skim *Green Technology* dalam bidang Teknologi Bioproses untuk menghasilkan pigmen hijau, yang dapat diaplikasikan pada berbagai bidang misalnya pangan, kosmetik, dan farmasi.

Penelitian terdahulu merupakan penelitian pendahuluan dalam sistem kultur jaringan tanaman katuk (*Sauropus androgynus*) yang menghasilkan kultur kalus katuk berupa kultur yang berwarna hijau dengan tekstur *friable* (remah) dengan profil pertumbuhan yang baik dalam medium Murashige dan Skoog (MS) yang disuplementasi dengan hormon asam -naftalen asetat (-NAA) dan 6-benziladenin (BA), seperti pada Yunita *et al.* (2013).

Hasil identifikasi profil molekuler (DNA) pada kultur kalus katuk tersebut menunjukkan adanya kemiripan dengan profil DNA pada daun katuk (Wigati, 2013). Hasil ini juga didukung dengan adanya kemiripan profil pigmen hijau dalam kalus katuk dengan profil pigmen dalam daun katuk (Andrew, 2014).

Hasil – hasil penelitian pendahuluan tersebut menjadi dasar untuk penelitian selanjutnya yang diajukan pada skim Penelitian Kompetensi, yaitu Penelitian Dasar, untuk tahun pertama dan tahun kedua. Penelitian tahun pertama akan melakukan kultivasi massa sel dalam sistem kultur suspensi sel, sebagai persiapan untuk penggunaan massa sel dalam bioreaktor. Percobaan kultivasi dilakukan sambil menganalisis produksi pigmen dalam kultur suspensi sel serta kemungkinan pigmen hijau diekskresi ke dalam medium kultur. Selanjutnya pada penelitian tahun kedua, dilakukan berbagai upaya untuk meningkatkan produksi pigmen hijau dalam kultur suspensi sel dengan optimasi medium serta penambahan komponen eksternal tidak hanya sebagai upaya untuk meningkatkan produksi pigmen namun juga untuk meningkatkan ekskresi pigmen ke dalam medium.

Penelitian yang diajukan ini merupakan tahap dasar dan kritis bagi keseluruhan penelitian produksi pigmen melalui kultur sel katuk karena berbagai kondisi optimum yang dihasilkan dari penelitian ini akan mendukung penggunaan massa sel katuk dalam bioreaktor yang merupakan proses kontinyu sehingga dapat digunakan dalam skala medium maupun skala besar dalam industri, untuk memproduksi pigmen hijau dari katuk. Peta jalan (*roadmap*) penelitian Produksi Pigmen Hijau dari Katuk dapat dilihat secara jelas pada gambar 3.1.



Gambar 3.1 Bagan alir penelitian untuk produksi pigmen hijau dalam kultur katuk (*Sauropus androgynus*)

Tahap – tahap penelitian ini dijabarkan dalam empat tahap utama, yang dipaparkan sebagai berikut.

3.1 Pembuatan Kultur Suspensi Sel Katuk

Kultivasi dilakukan dengan metode seperti pada Yunita *et al.* (2003) dengan melakukan pemindahan massa sel dari kultur kalus katuk $\pm 0,5$ gram secara aseptis ke dalam 25 ml medium cair Murashige dan Skoog (MS) yang mengandung hormon pertumbuhan asam -naftalen asetat (-NAA) 1 ppm dan 6-benziladenin (BA) 0,5 ppm di dalam erlenmeyer. Kultur dikultivasi selama 5 hari pada rotary shaker dengan kecepatan ± 100 rpm dan diletakkan di bawah lampu TL ± 1000 lux dengan suhu $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$.

Subkultur dilakukan hingga pada pasasi ke-5 dengan cara memindahkan massa sel ke dalam 25 ml medium steril baru. Kultur dikultivasi selama 5 hari pada *rotary shaker* dengan kecepatan ± 100 rpm dan diletakkan di bawah lampu TL ± 1000 lux dengan suhu $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$.

Indikator capaian pada tahap ini adalah terbentuknya kultur suspensi sel yang steril dengan warna sel yang hijau dan tekstur yang *friable*.

3.2 Pengamatan Identitas Kultur Suspensi Sel Katuk

Kultur suspensi sel yang telah berhasil dikultivasi, diamati identitasnya berdasarkan pengamatan terhadap morfologi sel (warna, tekstur), anatomi sel, dan profil molekuler (DNA) sel. Identifikasi anatomi sel menggunakan mikroskop cahaya, dengan daya pembesaran 10 x 100 sedangkan identifikasi profil molekuler (DNA) dilakukan dengan metode *Random amplified Polymorphic DNA* (RAPD) seperti metode pada penelitian Yunita dan Sulisetiorini (2013).

Indikator capaian pada tahap ini adalah terbentuknya kultur suspensi sel yang steril dengan warna sel yang hijau dan tekstur yang *friable*. Hasil pengamatan anatomi menunjukkan sel – sel yang utuh dan tidak membentuk agregat yang besar. Hasil identifikasi profil molekuler menunjukkan adanya kemiripan dengan profil DNA pada tanaman katuk dan kultur kalus pada penelitian sebelumnya (Wigati, 2013; Yunita dan Sulisetiorini, 2013).

3.3 Pengamatan Profil Pertumbuhan Kultur Suspensi Sel Katuk

3.3.1 Pengamatan terhadap % Packed Cell Volume (%PCV)

Erlenmeyer yang berisi kultur suspensi sel dikocok dengan hati – hati hingga homogen, lalu isi erlenmeyer dituang ke dalam gelas ukur 50,0 ml. Selanjutnya gelas ukur tersebut didiamkan selama 20 menit, selanjutnya diukur volume endapan. Harga % PCV dari minimal 3 replikasi, dapat diperoleh dengan perhitungan sebagai berikut (Yunita *et al.*, 2003)

$$\% \text{ PCV} = \frac{\text{Volume endapan (ml)}}{\text{Volume total suspensi sel (ml)}}$$

Indikator capaian dalam tahap ini adalah meningkatnya harga %PCV untuk kultur suspensi sel yang bertumbuh secara optimal.

3.3.2 Pengamatan terhadap Indeks Pertumbuhan (IP)

Kultur suspensi sel yang telah ditentukan % PCV nya, disaring dan hasil saringan ditimbang sehingga diperoleh berat basah sel (BB). Rumus indeks pertumbuhan untuk minimal tiga replikasi adalah sebagai berikut (Yunita *et al.*, 2003)

$$\text{IP} = \frac{\text{Berat basah sel saat panen (g)}}{\text{Berat sel saat kultivasi awal (g)}}$$

Indikator capaian dalam tahap ini adalah meningkatnya harga IP untuk kultur suspensi sel yang bertumbuh secara optimal.

3.4 Pengamatan Profil Pigmen dalam Kultur Suspensi Sel Katuk

Esktraksi pigmen dalam kultur suspensi sel katuk dengan metanol dilakukan sesuai dengan metode penelitian sebelumnya pada Andrew (2014). Ekstrak pigmen dalam kultur suspensi sel dan pigmen di dalam medium, masing-masing dianalisis dengan spektrofotometer (Shimadzu U-1800). Sebelum

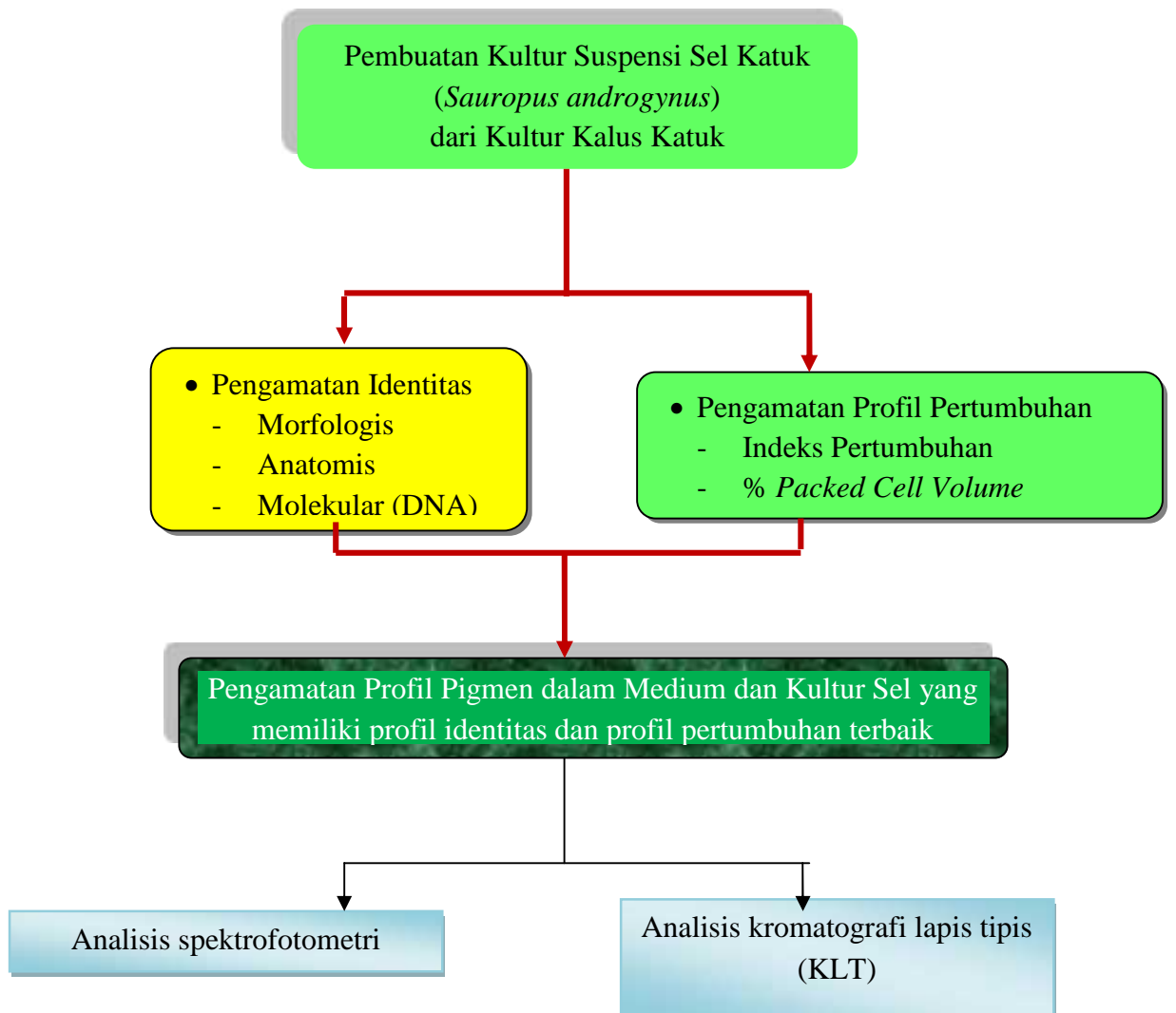
dilakukan pengamatan profil pigmen, dilakukan *scanning* terlebih dahulu untuk menentukan panjang gelombang maksimum dari pigmen. Setelah dilakukan *scanning*, didapatkan hasil pengamatan profil pigmen.

Ekstrak pigmen dalam kultur suspensi sel katuk dipekatkan dan ditotolkan pada lempeng KLT silika gel 60 F₂₅₄ ukuran 2,5 x 10 cm dengan pipa kapiler. Lempeng yang sudah diberi totolan ekstrak pigmen dimasukkan ke dalam *chamber* yang berisi 10 mL fase gerak (70% heksan : 30% aseton). Sampel diekluasi sampai dengan batas eluasi (0,5 cm dari atas lempeng). Hasil eluasi diamati di bawah sinar tampak, sinar UV 254 nm dan 365 nm, seperti pada Andrew (2014).

Indikator capaian dalam penelitian ini adalah adanya profil spektrum yang mirip dengan penelitian sebelumnya, dengan dua puncak pada panjang gelombang maksimum 616 nm dan 662 nm. Hasil pengamatan dengan KLT menunjukkan adanya 2 noda dengan harga R_f dari pigmen berwarna hijau biru = 0,46 dan R_f pigmen berwarna hijau kuning = 0,42.

3.5 Alur Penelitian

Penelitian diawali dengan pembuatan kultur suspensi katuk dengan pemindahan kultur kalus katuk dalam medium cair dengan komposisi hormon yang sesuai. Selanjutnya dilakukan subkultur hingga pasasi 5, untuk memberikan kesempatan tanaman untuk beradaptasi pada sistem kultur suspensi sel. Hasil kultivasi dianalisis dengan pengamatan terhadap identitas sel katuk melalui analisis morfologi, anatomi dan molekuler (DNA) serta pengamatan terhadap profil pertumbuhan kultur suspensi sel dan analisis terhadap profil pigmen, baik yang terkandung di dalam sel maupun di dalam medium. Tahap-tahap penelitian dilakukan seperti pada skema dalam gambar 3.2.



Gambar 3.2. Alur penelitian produksi pigmen hijau dalam kultur suspensi sel katuk

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

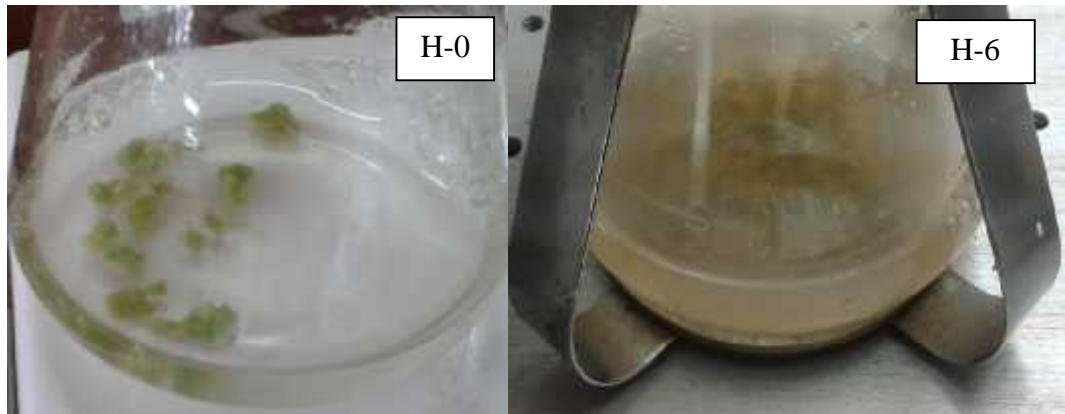
4.1 Hasil Induksi Kultur Suspensi Sel Katuk

Hasil penimbangan kultur kalus katuk yang telah dipilih untuk diinduksi menjadi kultur suspensi sel dapat dilihat pada tabel 4.1.

Tabel 4.1 Hasil Penimbangan Kultur Kalus Daun Katuk

Kultur	Berat (gram)	Warna kalus	Tekstur kalus
1	0,514	Hijau	Remah
2	0,520		
3	0,511		
4	0,502		
5	0,501		
6	0,524		
7	0,514		
8	0,521		
9	0,510		
10	0,506		
11	0,525		
12	0,516		
$\bar{X} = 0,514 \pm 8,0378 \times 10^{-3}$ (KV= 1,56%)			

Waktu subkultur kultur suspensi sel katuk ditentukan berdasarkan pengamatan visual terhadap kultur sebelum adanya perubahan warna medium menjadi coklat, yaitu sebelum hari ke-6. Pencoklatan pada kultur saat hari ke-6 kultivasi dapat diamati pada kultur suspensi sel pasasi ke-1. Hasil pengamatan kultur suspensi sel pada beberapa waktu subkultur dapat dilihat pada gambar 4.1.

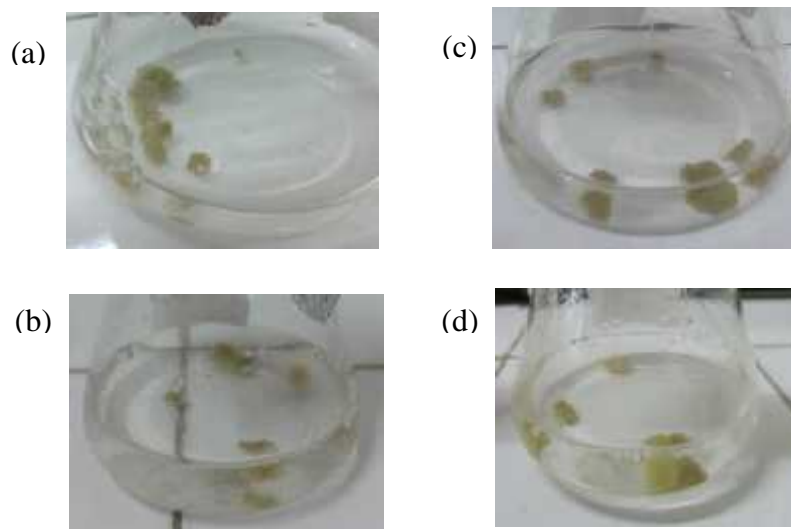


Gambar 4.1 Hasil pengamatan waktu subkultur kultur suspensi sel pasasi ke-1 pada hari ke-0 dan hari ke-6

Berdasarkan gambar 4.1, waktu subkultur yang sesuai untuk kultur suspensi sel katuk adalah sebelum hari ke-6 atau setiap hari ke-4 atau hari ke-5.

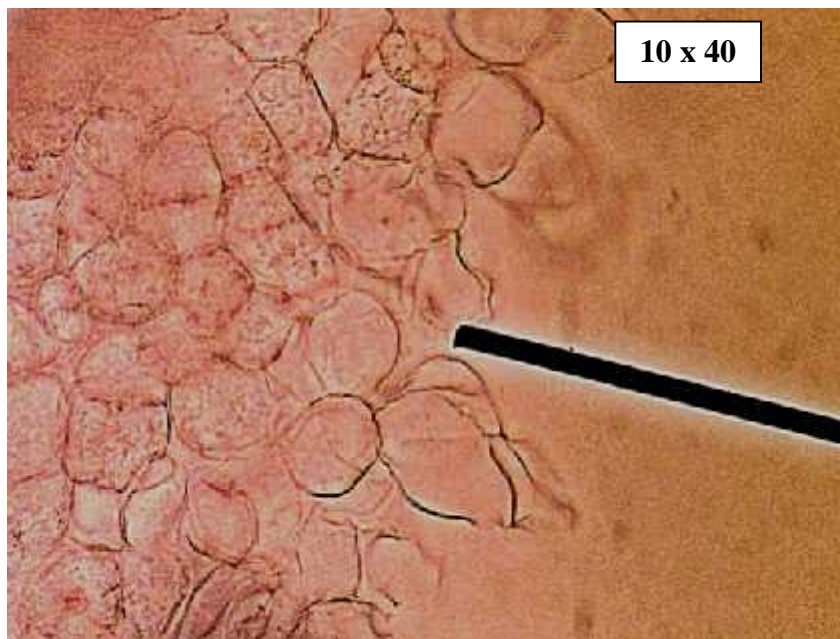
4.2 Hasil Pengamatan Identitas Kultur Suspensi Sel Katuk

Sampel kultur suspensi sel katuk memiliki karakteristik morfologis berupa massa sel yang berwarna hijau muda dan remah. Kultur suspensi sel katuk, pasasi ke-5, yang dipanen pada hari ke-1 (S_1), ke-3 (S_3), ke-4 (S_4), dan ke-6 (S_6), dapat dilihat pada gambar 4.2.



Gambar 4.2 Hasil sampling massa kultur suspensi sel katuk pasasi ke-5, (a) S_1 (b) S_3 (c) S_4 (d) S_6

Pengamatan mikroskopik terhadap kultur suspensi sel katuk menunjukkan adanya bentuk sel-sel parenkim yang sederhana dan belum terdeferensiasi. Sel yang diperoleh masih berkelompok. Hasil pengamatan mikroskopis kultur suspensi sel daun katuk dapat dilihat pada gambar 4.3.



Gambar 4.3 Pengamatan mikroskopis kultur suspensi sel katuk

Berdasarkan pengamatan mikroskopik sel dari kultur suspensi sel, masih terlihat adanya sel – sel parenkim pada katuk yang sederhana dan berkelompok. Hasil pengamatan mikroskopis tersebut serupa dengan hasil pengamatan Wigati (2013) terhadap kultur kalus daun katuk berupa sel parenkim yang masih belum terdeferensiasi.

Hasil pengukuran kualitas dan kuantitas DNA daun katuk dan kultur suspensi sel katuk dapat dilihat pada tabel 4.2.

Tabel 4.2 Hasil Pengukuran Kualitas dan Kuantitas DNA Daun dan Kultur Suspensi Sel Katuk

Kode	260	280	Kualitas DNA (260/ 280 nm)	Rata-rata	Kuantitas DNA (ng/μl)	Rata-rata (ng/μl)
S	0,243	0,113	2,150	2,160 ± 0,0658 (KV = 3,05 %)	486	594,4 ± 87,39 (KV = 15,06%)
	0,247	0,118	2,093		494	
	0,332	0,158	2,101		664	
	0,332	0,149	2,228		664	
	0,332	0,149	2,228		664	
D	0,719	0,372	1,933	1,937± 0,0122 (KV = 0,63%)	1456	1476,4 ± 43,07 (KV = 2,91%)
	0,721	0,373	1,933		1442	
	0,728	0,379	1,921		1438	
	0,762	0,392	1,944		1524	
	0,756	0,387	1,953		1522	

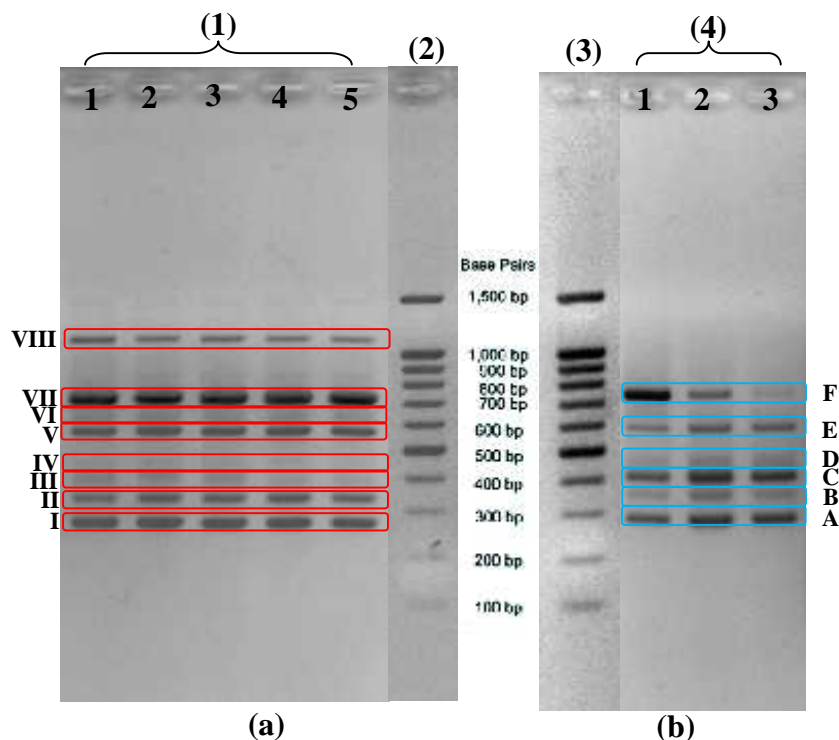
Keterangan : S: DNA kultur suspensi sel katuk, D: DNA daun katuk

Berdasarkan tabel 4.2 kualitas rata –rata DNA daun katuk adalah 1,937 dengan kuantitas 1476,4 ng/μl, sedangkan kualitas rata – rata DNA kultur suspensi sel katuk dalam medium MS cair yang disuplementasi dengan ZPT NAA 1 pp dan BA 0,5 ppm adalah 2,160 dengan kuantitas 594,4 ng/μl.

Isolat DNA daun katuk sudah murni, karena nilainya berada di antara 1,8 dan 2,0 sesuai dengan karakteristik yang disebutkan oleh Brown (2010) sedangkan hasil isolat DNA kultur suspensi sel masih kurang murni namun isolat DNA yang diperoleh masih dapat digunakan untuk PCR-RAPD seperti pada penelitian yang dilakukan oleh Wigati (2013).

Kuantitas isolat DNA daun katuk dan kultur suspensi sel katuk masing-masing secara berturut-turut menghasilkan 1476,4 ng/μl, dan 594,4 ng/μl, sudah memadai untuk tahap amplifikasi DNA dengan metode PCR-RAPD.

Pada tahap selanjutnya hasil amplifikasi isolat DNA dengan primer OPD-11 dengan metode PCR-RAPD, yang dipisahkan dengan elektroforesis menunjukkan pola larik DNA daun katuk dan kultur suspensi sel katuk, yang dapat dilihat pada gambar 4.4.



Gambar 4.4 Hasil elektroforesis dengan primer OPD-11 daun katuk (a), dan kultur suspensi sel katuk (b)

Keterangan :

2 & 3 = Marker 100 bp *ladder*, 1 = daun katuk, 4 = kultur suspensi sel katuk

Berdasarkan pola larik DNA daun dan kultur suspensi katuk pada gambar 4.4, terdapat kemiripan pita DNA pada daun dan pita DNA pada kultur suspensi sel, misalnya pita A yang sama dengan pita I, pita B yang sama dengan pita II, pita C yang sama dengan pita III, pita D yang sama dengan pita IV, pita E yang sama dengan pita V dan pita F yang sama dengan pita VII. Selain itu terdapat dua

pita yaitu pita VI dan pita VIII, yang tidak terdeteksi keberadaannya pada kultur suspensi sel katuk.

Ukuran fragmen DNA sebagai hasil amplifikasi menggunakan primer OPD-11 berkisar antara 273 dan 1156 bp, sedangkan pada kultur suspensi sel katuk berukuran 282 – 763 bp. Penelitian yang dilakukan oleh Wigati (2013) membandingkan pita DNA kultur kalus katuk dengan daun katuk yang diamplifikasi menggunakan primer OPF-7 diperoleh fragmen DNA yang berukuran 300-700 bp.

4.3 Hasil Pengamatan Profil Pertumbuhan Kultur Suspensi Sel Katuk

Kultur suspensi sel katuk yang diamati pertumbuhannya adalah kultur suspensi pasasi ke-5. Pengamatan pertumbuhan dilakukan untuk melihat tahapan-tahapan pertumbuhan kultur suspensi sel katuk dari tahap lag sampai mencapai tahap stasioner.

4.3.1 Pengamatan terhadap % Packed Cell Volume (% PCV)

Harga % PCV dinyatakan dengan membagi antara volume endapan dari massa sel (ml) dengan volume total medium kultur suspensi sel. Hasil pengukuran dari % PCV kultur suspensi sel katuk dapat dilihat pada tabel 4.3 dan tabel 4.4.

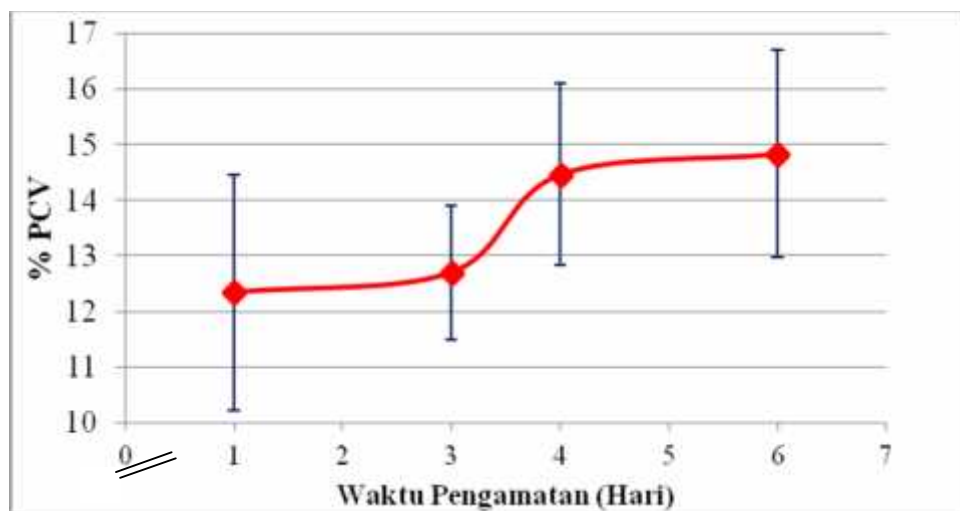
Tabel 4.3 Hasil Pengukuran % PCV Kultur Suspensi Sel Katuk Hari ke-1, 3, 4

Hari ke-	Berat kultur (gram)	Pengulangan ke-	Volume endapan (ml)	Volume medium (ml)	%PCV (%)	Rata-rata % PCV pengulangan (%)	Rata-rata % PCV per-hari (%)
1	0,493	1	3,0	24,0	12,50	13,19 ± 1,200 (KV = 9,10%)	12,34 ± 2,107 (KV=17,08%)
		2	3,5	24,0	14,58		
		3	3,0	24,0	12,50		
	0,501	1	3,0	24,0	12,50	13,89 ± 1,200 (KV = 8,65%)	
		2	3,5	24,0	14,58		
		3	3,5	24,0	14,58		
	0,500	1	2,5	28,5	8,77	9,94 ± 1,016 (KV = 10,22%)	
		2	3,0	28,5	10,53		
		3	3,0	28,5	10,53		
3	0,518	1	3,0	26,5	11,32	11,32 ± 0 (KV=0%)	12,70 ± 1,212 (KV =9,54%)
		2	3,0	26,5	11,32		
		3	3,0	26,5	11,32		
	0,522	1	3,5	26,5	13,21	13,21 ± 0 (KV=0%)	
		2	3,5	26,5	13,21		
		3	3,5	26,5	13,21		
	0,502	1	3,5	24,0	14,53	13,85 ± 1,172 (KV = 8,46%)	
		2	3,5	24,0	14,53		
		3	3,0	24,0	12,50		
4	0,516	1	2,5	21,0	11,90	12,69 ± 1,374 (KV = 10,83%)	14,47 ± 1,632 (KV=11,28%)
		2	2,5	21,0	11,90		
		3	3,0	21,0	14,28		
	0,523	1	4,0	27,0	14,81	14,81 ± 0 (KV=0%)	
		2	4,0	27,0	14,81		
		3	4,0	27,0	14,81		
	0,508	1	4,0	26,5	15,90	15,90 ± 0 (KV=0%)	
		2	4,0	26,5	15,90		
		3	4,0	26,5	15,90		

Tabel 4.4 Hasil Pengukuran % PCV Kultur Suspensi Sel Katuk Hari ke-6

Hari ke-	Berat kultur (gram)	Pengulangan ke-	Volume endapan (ml)	Volume medium (ml)	%PCV (%)	Rata-rata % PCV pengulangan (%)	Rata-rata % PCV per-hari (%)
6	0,520	1	4,0	31,5	12,70	12,70 ± 0 (KV=0%)	14,84 ± 1,858 (KV= 12,52%)
		2	4,0	31,5	12,70		
		3	4,0	31,5	12,70		
	0,525	1	4,0	25,0	16,00	16,00 ± 0 (KV=0%)	
		2	4,0	25,0	16,00		
		3	4,0	25,0	16,00		
	0,521	1	3,5	20,0	17,50	15,83 ± 1,443 (KV =9,12%)	
		2	3,0	20,0	15,00		
		3	3,0	20,0	15,00		

Hasil perhitungan % PCV kultur suspensi sel katuk digambarkan dengan grafik perhitungan % PCV kultur suspensi sel katuk yang dapat dilihat gambar 4.5.

**Gambar 4.5 Grafik % PCV kultur suspensi sel katuk (n=3)**

Peningkatan volume sel terbesar diperoleh pada hari ke 3-4. Data % PCV mendukung data dari IP kultur suspensi sel.

Pengukuran % PCV pada penelitian ini diukur pada hari ke-1, 3, 4, dan 6 secara berturut-turut adalah 12,34%, 12,70%, 14,47%, dan 14,84%. Penggambaran volume total sel secara kuantitatif dilakukan menggunakan % PCV (Settler, 2006). Penelitian yang dilakukan oleh Solis-Ramos *et al.* (2013) berhasil menginduksi kultur suspensi sel daun *Jatropha curcas* dengan hasil % PCV sebesar 17,3%.

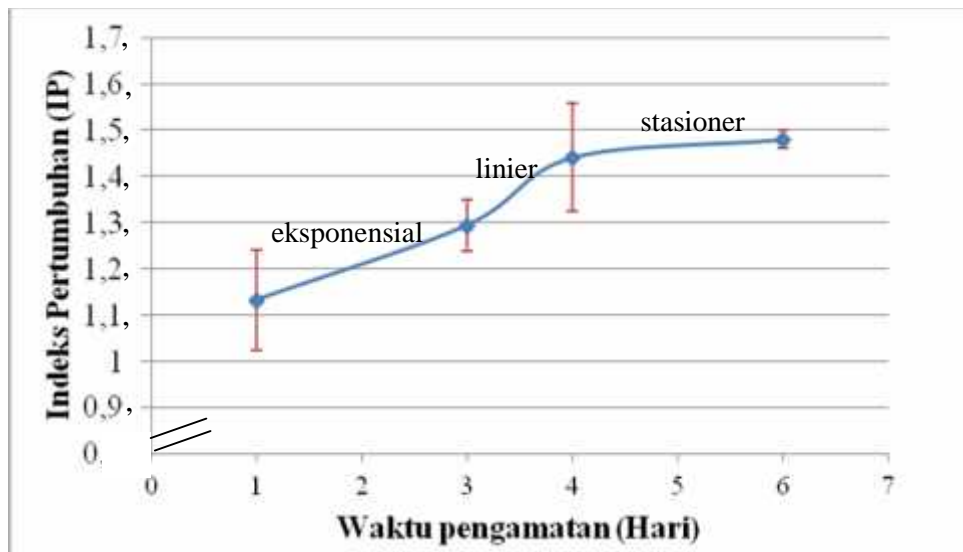
4.3.2 Pengamatan terhadap Indeks Pertumbuhan (IP)

Perhitungan Indeks Pertumbuhan (IP) dinyatakan dengan menggunakan berat basah dari massa kultur yang diperoleh pada hari-hari pengamatan tertentu. Harga IP dinyatakan dengan membagi antara berat akhir dari massa sel dengan berat awal massa sel yang dikultur. Hasil pengukuran dan perhitungan harga IP dapat dilihat pada tabel 4.5.

Tabel 4.5 Harga IP Kultur Suspensi Sel Daun Katuk

Hari ke-	Berat kultur (gram)	Berat awal (gram)	Berat akhir (gram)	Harga IP	Rata-Rata
1	0,493	0,493	0,514	1,043	1,133 ± 0,1094 (KV= 9,65%)
	0,501	0,501	0,629	1,255	
	0,500	0,500	0,551	1,102	
3	0,518	0,518	0,638	1,232	1,295 ± 0,0554 (KV= 4,28%)
	0,522	0,522	0,697	1,335	
	0,523	0,523	0,690	1,319	
4	0,516	0,516	0,681	1,320	1,441 ± 0,1167 (KV= 8,10%)
	0,523	0,523	0,758	1,449	
	0,508	0,508	0,789	1,553	
6	0,520	0,520	0,762	1,465	1,480 ± 0,0187 (KV= 1,27%)
	0,525	0,525	0,788	1,501	
	0,521	0,521	0,768	1,474	

Hasil perhitungan IP kultur suspensi sel katuk digambarkan dengan grafik IP yang dapat dilihat pada gambar 4.6.

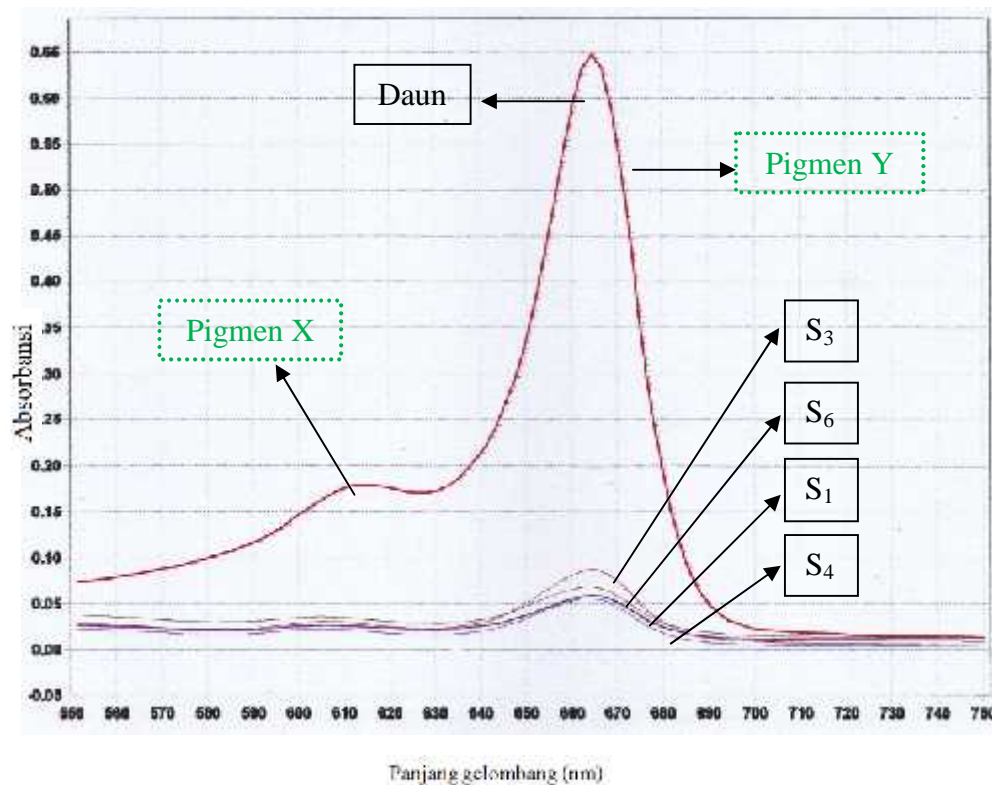


Gambar 4.6 Grafik harga IP kultur suspensi sel katuk (n=3)

Kecepatan pertumbuhan kultur suspensi sel daun katuk berdasarkan gambar 4.6 diperoleh pada hari ke 1-3 terjadi pembelahan sel yang cukup besar dan pada tahapan ini sel masuk ke dalam fase linier, sedangkan pada hari ke 3-4 antara sel yang membelah dan waktu yang diperlukan sel untuk membelah sama, fase ini disebut sebagai fase linier dan setelah hari ke 4-6 kecepatan pertumbuhan cenderung tidak terlalu cepat sebelum mencapai fase stasioner.

4.4 Hasil Pengamatan Profil Pigmen dalam Kultur Suspensi Sel Katuk

Hasil ekstraksi daun dan massa kultur suspensi katuk yang telah dipekatkan hingga ± 10 ml kemudian dianalisis dengan spektrofotometer. Analisis diawali dengan *scanning* panjang gelombang () maksimal dari pigmen hijau, yaitu pada rentang 550-750 nm. Masing-masing ekstrak dianalisis panjang gelombang dan absorbansinya minimal 3x replikasi. Profil pigmen hijau daun dan massa kultur suspensi sel katuk dapat dilihat pada gambar 4.7.



Gambar 4.7 Perbandingan profil pigmen hijau daun dan massa kultur suspensi sel katuk

Keterangan:

S₁ : Suspensi panen hari ke-1

S₃ : Suspensi panen hari ke-3

S₄ : Suspensi panen hari ke-4

S₆ : Suspensi panen hari ke-6

Pigmen X : Pigmen hijau pada antara 602,8 – 615,6 nm

Pigmen Y : Pigmen hijau pada antara 662,5 – 664,7 nm

Hasil analisis ekstrak pigmen pada daun dan massa kultur suspensi katuk dengan metode spektrofotometri pada panjang gelombang 550-750 nm dalam gambar 4.7 menunjukkan kemiripan. Daun katuk memiliki pigmen X terletak pada panjang gelombang antara 613,5-615,6 nm dan pigmen Y yang terletak pada

panjang gelombang 664,7 nm. Massa kultur suspensi katuk memiliki pigmen X yang terletak pada panjang gelombang antara 602,8-607,1 nm dan pigmen Y yang terletak pada panjang gelombang antara 662,5-664,7 nm. Panjang gelombang maksimum klorofil A menurut Hosikian *et al.* (2010) terletak pada panjang gelombang antara 660-665 nm dan klorofil B terletak pada panjang gelombang antara 642–652 nm sehingga pigmen X sama dengan pigmen B pada penelitian Andrew (2014) dan diduga merupakan klorofil B, sedangkan pigmen Y sama dengan pigmen A pada penelitian Andrew (2014) dan diduga merupakan klorofil A. Pigmen X dan Y yang diperoleh menunjukkan bahwa pigmen hijau tidak terdegradasi karena metode pemekatan yang digunakan sudah tepat. Panjang gelombang dan absorbansi masing-masing ekstrak daun dan massa kultur suspensi katuk dapat dilihat pada tabel 4.6.

Tabel 4.6 Hasil Analisis Pigmen Hijau Daun dan Massa Kultur Suspensi Katuk dengan Spektrofotometer

Nama	Pigmen			
	X		Y	
	max (nm)	Absorbansi	max (nm)	Absorbansi
Daun (n = 3)	613,467	0,1744640	664,667	0,6427200
	615,600	0,1791270	664,667	0,6471480
	615,600	0,1783230	664,667	0,6453160
Rata-rata ± SD	614,889 ± 1,2300	0,1773047 ± 2,4927 x 10⁻⁴	664,667 ± 0,0000	0,6450613 ± 2,22496 x 10⁻³
KV	0,20%	1,41%	0,00%	0,34%
S ₁ (n = 3)	604,933	0,0261498	664,667	0,0589892
	604,933	0,0260245	664,667	0,0588123
	604,933	0,0254927	664,667	0,0581194
Rata-rata ± SD	604,933 ± 0,0000	0,0258890 ± 3,4888 x 10⁻⁴	664,667 ± 0,0000	0,0586403 ± 4,5970 x 10⁻⁴
KV	0,00%	1,35%	0,00%	0,78%
S ₃ (n = 3)	604,933	0,0305158	664,667	0,0873841
	607,067	0,0301282	664,667	0,0870277
	607,067	0,0303200	664,667	0,0876885
Rata-rata ± SD	606,356 ± 0,0900	0,0303213 ± 1,9380 x 10⁻⁴	664,667 ± 0,0000	0,0873668 ± 3,3074 x 10⁻⁴
KV	0,24%	0,64%	0,00%	0,38%
S ₄ (n = 3)	604,933	0,0219175	664,667	0,0554559
	604,933	0,0225469	664,667	0,0558958
	604,933	0,0223928	662,533	0,0570085
Rata-rata ± SD	604,933 ± 0,0000	0,0222857 ± 3,2808 x 10⁻⁴	663,956 ± 1,2300	0,0561200 ± 8,0023 x 10⁻⁴
KV	0,00%	1,47%	0,19%	1,43%
S ₆ (n = 3)	604,933	0,0354896	664,667	0,0684165
	604,933	0,0358277	662,533	0,0685632
	602,800	0,0364387	662,533	0,0691790
Rata-rata ± SD	604,222 ± 1,2300	0,0359187 ± 4,8104 x 10⁻⁴	663,244 ± 1,2300	0,0687196 ± 4,0459 x 10⁻⁴
KV	0,20%	1,34%	0,19%	0,59%

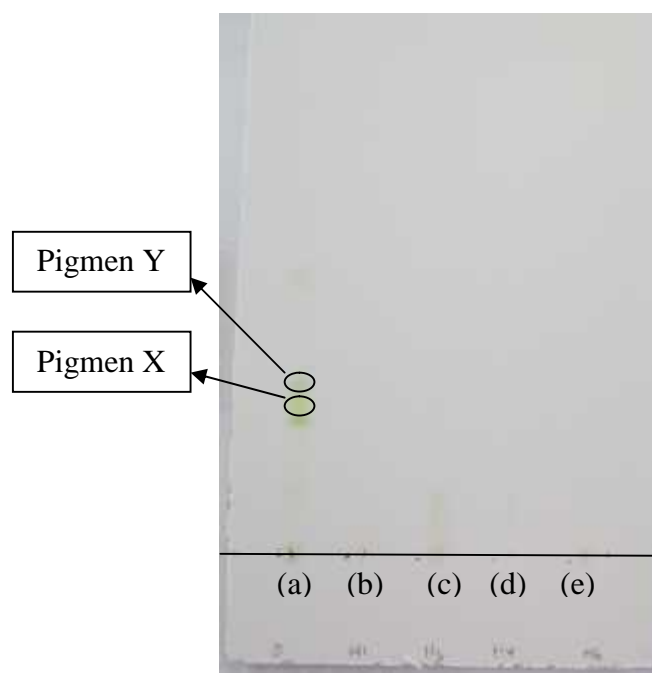
Keterangan:

- S₁ : Suspensi panen hari ke-1 S₃ : Suspensi panen hari ke-3
S₄ : Suspensi panen hari ke-4 S₆ : Suspensi panen hari ke-6
SD : Standar deviasi KV : Koefisien variasi
: Panjang gelombang

Hasil absorbansi massa kultur suspensi pasasi ke-5 yang dipanen pada hari ke-3 dan ditimbang sebanyak 0,5094 gram, memberikan absorbansi 0,0873668 untuk pigmen Y atau

pigmen A dan 0,0303213 untuk pigmen X atau pigmen B. Penelitian Andrew (2014) yang menganalisis kalus katuk dengan jumlah penimbangan yang sama yaitu ± 500 mg, diperoleh hasil absorbansi pigmen A sebesar 0,0505 dan absorbansi pigmen B sebesar 0,017.

Analisis ekstrak daun katuk yang dilihat pada sinar tampak memberikan hasil dua noda yaitu hijau kebiruan dan hijau kekuningan yang diperkirakan sebagai pigmen hijau. Hasil eluasi ekstrak daun dan massa kultur suspensi katuk dapat dilihat pada gambar 4.8.

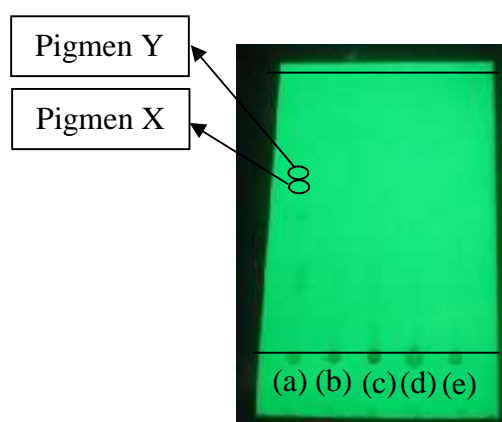


Gambar 4.8 Hasil eluasi ekstrak (a) daun katuk ($R_f Y = 0,425$, $R_f X = 0,363$), (b) S_1 (c) S_3 (d) S_4 (e) S_6 yang dilihat dengan sinar tampak

Hasil eluasi ekstrak pigmen hijau daun katuk dengan metode KLT yang dilihat pada sinar tampak memberikan dua noda, berwarna hijau kebiruan dan hijau kekuningan. Noda berwarna hijau kebiruan atau pigmen Y diduga merupakan klorofil A dengan harga $R_f = 0,425$ dan noda berwarna hijau kekuningan atau pigmen X diduga merupakan klorofil B

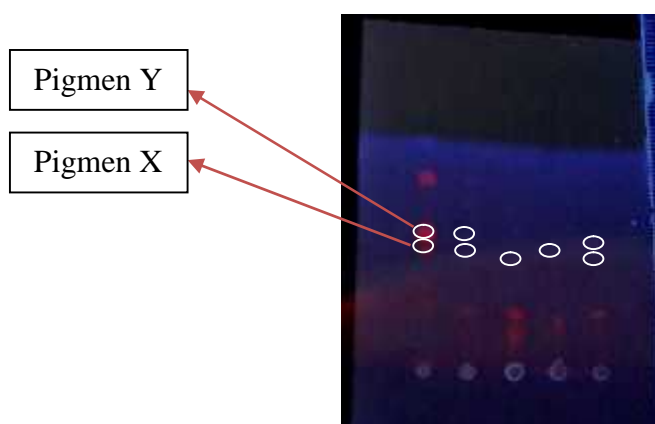
dengan harga $R_f = 0,363$. Klorofil A memiliki harga R_f lebih tinggi dibandingkan klorofil B karena klorofil A bersifat non polar sehingga akan ikut tertarik bersama dengan fase gerak yang juga bersifat non polar sedangkan klorofil B bersifat lebih polar sehingga akan tertahan pada silika gel yang bersifat polar (Prasetyo *et al.*, 2012).

Analisis ekstrak daun katuk yang dilihat menggunakan sinar UV 254 nm memberikan hasil dua noda. Hasil eluasi ekstrak daun dan massa kultur suspensi yang dilihat dengan menggunakan sinar UV 254 nm dapat dilihat pada gambar 4.9.



Gambar 4.9 Hasil eluasi ekstrak daun dan kultur suspensi dilihat dengan menggunakan sinar UV 254 nm, (a) daun katuk ($R_f Y = 0,425$, $R_f X = 0,363$) (b) S_1 (c) S_3 (d) S_4 (e) S_6

Analisis ekstrak daun katuk, S_1 dan S_6 yang dilihat menggunakan sinar UV 366 nm memberikan hasil dua noda, sedangkan S_3 dan S_4 hanya memberikan satu noda yang dapat dilihat pada gambar 4.10.



Gambar 4.10 Hasil eluasi ekstrak daun dan kultur suspensi dilihat dengan menggunakan sinar UV 366 nm, (a) daun ($R_f Y = 0,425$, $R_f X = 0,363$); (b) S_1 ($R_f Y = 0,388$, $R_f X = 0,350$); (c) S_3 ($R_f X = 0,313$); (d) S_4 ($R_f X = 0,350$); (e) S_6 ($R_f Y = 0,375$, $R_f X = 0,338$)

Hasil eluasi ekstrak pigmen hijau massa kultur suspensi katuk yang dilihat di bawah sinar UV 366 nm memberikan hasil antara lain suspensi panen hari ke-1 (S_1) dengan harga Rf X = 0,350; Rf Y = 0,388; suspensi panen hari ke-3 (S_3) dengan harga Rf X = 0,313; suspensi panen hari ke-4 (S_4) dengan harga Rf X = 0,350; suspensi panen hari ke-6 (S_6) dengan harga Rf X = 0,338 dan Rf Y = 0,375. Berdasarkan Quereshi *et al.* (2011) yang melakukan KLT terhadap *Oleum americanum*, klorofil A memberikan harga Rf sebesar 0,40 dan klorofil B dengan harga Rf sebesar 0,38 sehingga pigmen X diperkirakan adalah klorofil B dan pigmen Y diperkirakan adalah klorofil A.

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kultur suspensi sel katuk (*Sauropus androgynus*) yang diinduksi dalam medium *Murashige and Skoog* (MS) cair yang disuplementasi dengan asam -naftalen asetat (NAA) 1 ppm dan 6-benzil adenine (BA) 0,5 ppm, merupakan kultur suspensi sel yang berwarna hijau dengan profil pertumbuhan yang baik berdasarkan harga Indeks Pertumbuhan (IP) dan % *Packed Cell Volume* (PCV).

Profil spektrum pigmen hijau dalam massa kultur suspensi sel katuk menunjukkan λ_{\max} pigmen X terletak pada 602,8-607,1 nm dan λ_{\max} pigmen Y terletak pada 662,5 - 664,7 nm. Profil kromatogram pigmen hijau dalam massa kultur suspensi sel katuk yang dipanen pada hari ke-1 (S_1) dan panen hari ke-6 (S_6) yang dilihat di bawah sinar UV 366 nm memberikan dua noda, dengan harga Rf X = 0,350 dan harga Rf Y = 0,388 untuk S_1 sedangkan harga Rf X = 0,338 dan harga Rf Y = 0,375 untuk S_6 . Massa kultur suspensi panen hari ke-3 (S_3) dan ke-4 (S_4) hanya memberikan satu noda dengan harga Rf X S_3 = 0,313; Rf X S_4 = 0,350.

Berdasarkan hasil penelitian tersebut perlu dilakukan peningkatan produksi pigmen hijau dalam kultur suspensi sel katuk serta perlu dilakukan optimasi metode kultur suspensi sel agar pigmen hijau dapat disekresikan dalam medium.

DAFTAR PUSTAKA

- Agil, M., 2000. Isolation the Lactagogue Compound from *Sauropus androgynus* (L.) Merr. Leaves, Dissertation, Postgraduate Program, Airlangga University, Surabaya.
- Andarwulan, N., Batari, R., Sandrasari, D.A., Bolling, B., Wijaya, H., 2010. Flavonoid Content and Antioxidant Activity of Vegetables from Indonesia. *Food Chemistry* 121, 1231-1235.
- Andrew, 2014. Profil Pigmen Hijau Pada Daun dan Kalus Katuk (*Sauropus androgynus*) dalam Medium yang Disuplementasi dengan Asam -Naftalen Asetat dan 6- Benzil Adenin. Skripsi, Fakultas Farmasi, Universitas Surabaya.
- Aobchey, P., Sriyam, S., Praharnipoorab, W., Lhieochaiphant, S., Phutrakul, S., 2002. Production of Red Pigment from the Root of *Morinda angustifolia* Roxb. Var. *Scabridula* Craib. By Root Cell Culture, *CMU Journal*, Vol.1(1): 66-78.
- Azis, S., Muktiningsih, S.R. 2006 Studi Manfaat Daun Katuk (*Sauropus androgynus*), *Cermin Dunia Kedokteran*, No. 151, 48-50
- Benjapak, N., Swatsitang, P., Tanpanich, S., 2008. Determination of Antioxidant Capacity and Nutritive Values of Pak-Wanban (*Sauropus androgynus* L. Merr.). *Khon Kaen University Science Journal* 36, 279-289.
- Bermawie, N., 2004. Inventory, Documentation and Status of Medicinal Plants Research in Indonesia. In: Batugal, P.A., Kanniah, J., Lee, S.Y., Oliver, J.T. (eds). *Medicinal Plants Research in Asia, Volume I*. International Plant Genetic Resource Institute-Regional Office for Asia, the Pacific and Oceania (IPGRI-APO), Serdang, Malaysia.
- Brown TA, 2010, *Gene Cloning and DNA Analysis: An Introduction*, 6th edition, Blackwell Publishing Ltd, Oxford, United Kingdom, Capter 4,3,10,11, hal. 37,70,181,228-236
- Chengaiyah, B., Rao, K.M., Kumar, K.M., Alagusundaram, M., Chetty, C.M. 2010. Medicinal Importance of Natural Dyes – A Review, *International Journal of PharmTech Research CODEN (USA)*, Vol. 2, No. 1, 144-154.
- Ching, L.S., Mohamed, S. 2001. Alpha-Tocopherol Content in 62 Edible Tropical Plants, *J.Agric. Food Chem*, Vol. 49, 3101-3105.
- Depkes RI, 2001, *Inventaris Tanaman Obat Indonesia (I) Jilid 2*, Jakarta.
- Gothandam, K.M., Aishwarya, R., Karthikeyan, S., 2010. Preliminary Screening of Antimicrobial Properties of Few Medicinal Plants. *Journal of Phytology* 2, 1-6.
- Gupta, K., Garg, S., Singh, J., Kumar, M., 2013. Enhanced Production of Naphthoquinone metabolite (shikonin) from cell suspension cultures of *Arnebia* sp. And it up-scaling through bioreactor, *3 Biotech*.
- Hardjanti, S., 2008. Potensi Daun Katuk sebagai Sumber Zat Pewarna Alami dan Stabilitasnya selama Pengeringan Bubuk dengan Menggunakan Binder Maltodekstrin, *Jurnal Penelitian Saintek*, Vol. 13, No.1, 1-18.
- Hasanah, M. 2005. Penelaahan terhadap Plasma Nutfah Khusus Tanaman Obat, Komisi Nasional Sumber Daya Genetik, Republik Indonesia, [Online]. Tersedia : http://indoplasma.or.id/artikel/artikel_2005_penelaahan_pn_khusus.htm. [22 Agustus 2011].
- Herudiyanto, M., 2009. Pengaruh Cara Blansing Pada Beberapa Bagian Tanaman Katuk (*Sauropus androgynus* L. Merr) Terhadap Warna Dan Beberapa Karakteristik Lain Tepung Katuk. Unpad. Skripsi.
- Hosikian A, Lim S, Halim R, et al, 2010, Chlorophyll Extraction from Microalgae: A Review on the Process Engineering Aspects, *International Journal of Chemical Engineering*
- Materia Medika Indonesia* V, 1980. Departemen Kesehatan Republik Indonesia.

- Miean, K.H., Mohamed, S. 2001. Flavonoid (Myricetin, Quercetin, Kaempferol, Luteolin and Apigenin) Content of Edible Tropical Plants
- Norhayati, Y., Nor'Aini, M.F., Misri, K., Marziah, M., Azman, J., 2011. -tocopherol, Ascorbic Acid, and Carotenoid Content in *Centella asiatica* Leaf Tissues and Callus Cultures, *Pertanika J. Trop. Agric. Sci.*, 34 (2): 331-339.
- Paul, M., Anto, K.B. 2011. Antibacterial Activity of *Sauropus androgynus* (L.) Merr., *International Journal of Plant Sciences*, Vol. 6, Issue 1, 189-192
- Prasetyo Susiana, Sunjaya Henny, Yanuar Yohanes, 2012, Pengaruh Rasio Massa Daun Suji / Pelarut, Temperatur dan Jenis Pelarut pada Ekstraksi Klorofil Daun Suji secara Batch Dengan Pengontakan Dispersi, Universitas Praahayangan
- Quereshi Sadaf, Purwar Pankhuri, Singh Rupal, Khan Noor A, Mani Abin, Patel Jaswant, 2011, Studies on Essential Oils and DNA Extraction from *Ocimum* species, *Jurnal of Phytology*, 3 (8):23-27
- Radfar, M., Sudarshana, M.S., Niranjan, M.H., 2012. Betalains from Stem Callus Cultures of *Zaleya decandra*, *Journal of Medicinal Plants Research*, Vol. 6(12): 2443-2447.
- Rahmat, A., Kumar, V., Fong, L.M., Endrini, S., Sani, H.A., 2003. Determination of Total Antioxidant Activity in Three Types of Local Vegetable Shoots and The Cytotoxic Effect of Their Ethanolic Extracts against Different Cancer Cell Lines. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* 12, 292–295.
- Rukmana HR, Harahap IM, 2011, *Katuk Potensi dan Manfaatnya*, Kanisius, Yogyakarta
- Settler M, Jaccard N, Hacker D *et al.*, 2006, New Disposable Tube for Rapid and Precise Biomass Assessment for Suspension Culture of Mammalian Cell, *Wiley InterScience: Biotechnology and Bioengineering* 95 (6):1228-1233
- Solis-Ramos YL, Carballo M L, Valdez-Malera M, 2013, Establishment of Cell Suspension Cultures of Two Costa Rican *Jatropha* Species Euphorbiaceae, *Rev. Biol. Trop.* 61 (3): 1095-1107
- Sripanidkulchai, B., Homhual, S., Poeknapo, C., 2005. Analysis of Antioxidant Vitamins in 30 Thai Vegetables by High-Performance Liquid Chromatographic Method. *Isan Journal of Pharmaceutical Sciences* 1, 58-69.
- Sudiarto, Maslahah, N., Sukmajaya, D. 2002. Pengaruh Pupuk Organik terhadap Pertumbuhan dan Produksi Katuk (*Sauropus androgynus* (L.) Merr.), *Jurnal Littri*, Vol. 8, No.3, 77-78
- Universitas Surabaya, 2011. Rencana Induk Penelitian 2012-2016.
- Wigati, B.A., 2013. *Inisiasi dan Karakterisasi Molekuler Kalus Sauropus androgynus* (L.) Merr. dalam Medium yang Disuplementasi Asam -Naftalen Asetat dan 6-Benzil Adenin, Skripsi, Surabaya, Fakultas Farmasi Universitas Surabaya
- Yang, R.Y., Lin, S., Kuo, G., 2008. Content and Distribution of Flavonoids among 91 Edible Plant Species. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* 17, 275-279.
- Yu, S.F., Shun, C.T., Chen, T.M., Chen, Y.H. 2006. 3-O- -D-Glucosyl-(1 6)- -D-glucosyl kaempferol Isolated from *Sauropus androgynus* Reduces Body Weight Gain in Wistar Rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 29, 2510-2513.
- Yunita, O., Widjaja, I., Syahrani, A., Indrayanto, G., 2003. Optimizing the Formation of p-aminobenzoic acid-7-O-β-D-glucopyranosyl ester from p-aminobenzoic acid in Cell Suspension Cultures of *Solanum mammosum*, *Bulletin of The Indonesian Society of Natural Products Chemistry*, Vol. 3., 1:20-23
- Yunita, O., 2011. *Karakterisasi Profil Metabolit dan Uji Toksisitas In Vitro Ekstrak Daun Katuk (Sauropus androgynus), sebagai Upaya Pengujian Keamanan Suplemen Herbal*, Disertasi, Surabaya, Program Pascasarjana Universitas Airlangga
- Yunita, O., Sulisetiorini, 2013. *DNA Fingerprinting on ITS Region of Sauropus androgynus DNA from East Java, by Random Amplified Polymorphic DNA Method*, Malang,

Proceedings of Humboldt Kolleg in conjunction with The Internasional Conference on Natural Sciences

Yunita, O., Wigati, B.A., Puspitasari, M.D., Meliyani. 2013. Induction Of Green Pigmented Callus Tissue From *Sauropus androgynus*, 2nd Natural Pigment Conference for South-East Asia, Ma Chung University, Indonesia, July 12-13, 2013

LAMPIRAN 1. INSTRUMEN

Laminair Air Flow (LAF)



Shaker



Timbangan Analitik



Termohigrometer



Moisture analitical



Autoklaf



Oven listrik



Sentrifus dingin



Lemari Pendingin -80°C



Ultrasonik



Waterbath



Microwave



Spektrofotometer



Lampu UV



Mesin PCR



Tangki elektroforesis



BioDocAnalyse
Biometra

LAMPIRAN 2. PERSONALIA PENELITI

NO.	Nama	Program Studi/Laboratorium	Bidang ilmu	Alokasi waktu (jam/minggu)	Uraian tugas
1.	Ketua Peneliti	Fakultas Farmasi / Laboratorium Biologi Farmasi	Bioteknologi Farmasi	20	<ul style="list-style-type: none"> • Merancang skema kerja penelitian • Melakukan penelitian • Memonitor dan mengevaluasi hasil penelitian
2.	Laboran 1	Fakultas Teknobiologi / Laboratorium Kultur Jaringan	Kultur Jaringan	10	Membantu proses kultivasi
3.	Laboran 2	Fakultas Teknobiologi / Laboratorium Biomolekuler	Biologi Molekuler	10	Membantu proses analisis PCR dan elektroforesis