

Analisis Pendahuluan Metabolit Sekunder dari Kalus Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* [Scheff.] Boerl.)

ERLINDHA GANGGA^{1*}, HERNITA ASRIANI¹, LINDA NOVITA²

¹Fakultas Farmasi Universitas Pancasila
Srengseng Sawah, Jagakarsa, Jakarta Selatan 12640
²Balai pengkajian Bioteknologi, BPPT, Puspiptek, Serpong

Diterima 25 Desember 2006, Disetujui 12 Februari 2007

Abstract: Callus is a cell mass which is formed by cell tissues and formed in explants surface or explants slice which divide them continuously in a controlled condition. With tissue culture method, the aim in using callus is for reproduce new plants to get the secondary metabolite which match with the secondary metabolite from the origin plants. Mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* [Scheff.] Boerl.), from Thymelaceae family is a very useful plant which can be used for medicine. Its leaves and seed's skin are the most important parts that usually used. In this experiment, Mahkota's seed is planted in germination media to get a sterile plant, and then from the plant, we take the leaves for callus initiation. We do a phytochemical filtering, TLC, and HPLC tests with this callus that we produced then we compared the result with Mahkota Dewa's leaves. From the phytochemical filtering result we found that both of them have alkaloid secondary metabolite, flavonoid saponin, tannin, steroid/triterpenoid. We also found some chromatograms which are similar in TLC and HPLC.

Key words: *Phaleria macrocarpa*, TLC, HPLC, callus

PENDAHULUAN

Tanaman memiliki daya regenerasi yang kuat, hal ini telah lama disadari dan ini adalah merupakan titik tolak berkembangnya industri kultur jaringan tanaman. Beberapa peneliti mengembangkan hasil penelitian sebelumnya bahwa sel/jaringan dapat ditanam secara terpisah dalam suatu kultur/media tertentu⁽¹⁾.

Usaha pengembangan tanaman dengan metoda kultur jaringan tanaman merupakan usaha perbanyak varietas tanaman/spesies tanaman secara vegetatif. Spesies tanaman yang sering dikembangkan adalah tanaman hias, bunga, tanaman pertanian seperti sayur-sayuran, buah-buahan⁽²⁾. Selain untuk perbanyak varietas tanaman, saat ini kultur jaringan diarahkan untuk beberapa tujuan, antara lain untuk memproduksi metabolit sekunder (alkaloid, flavonoid, dll).

Dalam bidang farmasi, metoda kultur jaringan tanaman ini menguntungkan karena dapat menghasilkan suatu metabolit sekunder yang berguna untuk

pengobatan dan menjaga kesehatan dalam jumlah besar, serta tumbuh dalam waktu cepat pada lahan yang terbatas⁽²⁾. Awalnya, mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* [Scheff.] Boerl.) dibudidayakan sebagai tanaman hias dan digunakan sebagai tanaman peneduh, tetapi saat ini berguna/manfaat sebagai salah satu tanaman obat tradisional yang dikenal merupakan obat asli Indonesia. Sampai saat ini sudah banyak penyakit yang berhasil disembuhkan tergantung pada bagian tanaman yang digunakan. Bagian yang digunakan biasanya memberikan efek yang berbeda terhadap jenis penyakit yang dapat diobati/d disembuhkan^(3,4).

Bagian yang paling sering dipakai adalah: (1) Daunnya, digunakan dengan cara merebusnya. Penyakit yang dapat diobati yaitu, lemah syahwat, disentri, alergi, dan tumor. (2) Kulit dan daging buah juga sering digunakan untuk pengobatan flu, rematik dan kanker rahim. Beberapa keunggulan dari mahkota dewa ini menjadikannya salah satu tanaman obat yang mendapatkan perhatian cukup besar untuk terus dikembangkan⁽³⁾.

Dalam beberapa hasil penelitian diketahui bahwa mahkota dewa kaya akan kandungan kimia tetapi belum semuanya terungkap. Dalam daun dan kulit

* Penulis korespondensi, Hp. 08128170958,
email: erlinda-gangga@yahoo.com

buahnya terkandung alkaloid, terpenoid, saponin dan flavonoid, sedangkan pada daunnya ditemukan senyawa lignan (polifenol)^(3,4).

Beberapa keunggulan yang dimiliki oleh mahkota dewa menyebabkan mahkota dewa mendapatkan perhatian yang besar dari beberapa negara. Saat ini mahkota dewa sedang diteliti dan dikembangkan secara serius sebagai obat untuk penyembuhan beberapa penyakit. Negara yang sedang mengembangkan penelitian ini antara lain: Belanda, Taiwan, Singapura, dan Malaysia⁽⁴⁾.

Tujuan penelitian ini adalah untuk membuktikan bahwa metoda kultur jaringan tanaman mahkota dewa menghasilkan metabolit sekunder yang sama dengan metabolit sekunder yang dihasilkan dari tanaman asalnya.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Biji mahkota dewa yang digunakan diperoleh dari Kebun Raya Bogor. Media kultur jaringan (Media MS) kloroform, alkohol, akuades, metanol, natrium hipoklorit, ammonia, asam klorida, amil alkohol, ferri (III) klorida, formaldehid, natrium asetat, natrium hidroksida, eter, petroleumeter, *n*-heksan, etil asetat, anisaldehyd, asam sulfat, agar, gula, mio-inositol, sitokinin (BAP), hormon, auksin (2-4-D), pereaksi Liebermann Bouchard, Dragendorff, pereaksi Mayer, pereaksi Stiasny.

METODE. Menumbuhkan tanaman steril. Buah segar tanaman mahkota dewa dicuci bersih dibawah air mengalir di dalam *Laminar Air Flow* (LAF), kemudian permukaan buah disterilkan menggunakan alkohol 90% selama 1 menit, lalu biji dipisahkan dari daging buah. Biji yang diperoleh digunakan sebagai eksplan untuk menumbuhkan tanaman steril. Eksplan ditanam pada media semi padat dengan cara yang aseptis, dilakukan di dalam LAF kabinet untuk mencegah terjadinya kontaminasi ataupun cemaran mikrob.

Kultur kalus. (a) Tahap inisiasi. Inisiasi kultur kalus dilakukan menggunakan daun mahkota dewa sebagai sumber eksplan yang diperoleh dari tanaman steril biji mahkota dewa yang ditumbuhkan pada media dasar MS dengan penambahan zat pengatur tumbuh untuk menginisiasi kultur kalus. Kultur disimpan di ruang gelap dan pertumbuhan kalus diamati setiap minggu. (b) Tahap perbanyak kalus. Perbanyak kalus dilakukan dengan memindahkan /subkultur masa kalus kedalam media baru berulang kali (media yang digunakan boleh sama) pada periode tertentu menggunakan media tumbuh yang paling optimal dan pemberian zat pengatur tumbuh yang paling sesuai untuk mempercepat dan

memperbanyak tumbuhnya kalus. (c) Uji penapisan fitokimia. Kalus yang berasal dari daun tanaman steril dan daun tanaman liar mahkota dewa dikumpulkan kemudian ditimbang, lalu dikeringkan dengan cara diangin-anginkan, kemudian ditimbang kembali untuk memperoleh bobot kalus dan daun kering. Selanjutnya dilakukan penapisan fitokimia terhadap kalus kering dan daun kering mahkota dewa (sebagai pembandingan). Uji penapisan menggunakan metoda Farnsworth⁽⁹⁾. (d) Pembuatan ekstrak. Serbuk daun dan kalus mahkota dewa ditimbang masing-masing 10 gram dimaserasi 4x dengan metanol, tiap kali 250 ml. Hasil maserasi dipekatkan dengan vakum rotavapor sampai diperoleh ekstrak kental kalus dan daun. (e) Pembuatan media. Media yang digunakan adalah media yang diperkenalkan oleh Murashige dan Skoog (Media MS). Media ini umumnya sering digunakan sebagai media dasar dari metode kultur jaringan. Timbang bahan-bahan penyusun media se-jumlah tertentu sesuai kebutuhan. pH larutan/media diatur sekitar 5,8. Media kemudian dimasukkan ke dalam wadah/tabung kultur steril yang telah dipersiapkan lalu sterilkan dalam autoklaf dengan suhu 121°C selama 20 menit. Selanjutnya media disimpan dalam ruang kultur sebelum digunakan.

Analisa kualitatif secara KLT (kromatografi lapis tipis). Terhadap ekstrak kental daun dan kalus mahkota dewa dilakukan uji analisis kualitatif menggunakan metode KLT dengan fase gerak cairan eluasi campuran antara *n*-heksan - etil asetat - isopropanol (1 : 2 : 17). Hasil KLT (kromatogram) dilihat dengan sinar UV λ 254 nm dan 366 nm kemudian disemprot dengan penampak bercak yang terdiri dari campuran anisaldehyd dan asam sulfat pekat.

Analisa kualitatif secara KCKT (kromatografi cair kinerja tinggi). KCKT adalah tehnik pemisahan berdasarkan fase diam padat (kolom nukleosil C₁₈ dan fase gerak cair (metanol - air dengan perbandingan 10 : 90) dengan tekanan tinggi, sehingga terjadi pemisahan secara partisi, adsorpsi ataupun penukar ion, tergantung fase diam yang digunakan. Pada ekstrak kental kalus dan daun dilakukan analisa kualitatif secara KCKT untuk mengetahui profil kromatogram senyawa metabolit sekunder yang terkandung didalamnya. Pada panjang gelombang (λ) 230 nm dan 300 nm. Volume injeksi 20 μ l.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Menumbuhkan tanaman steril. Pada pertumbuhan tanaman steril yang berasal dari

biji buah mahkota dewa menggunakan media pertumbuhan yang terdiri dari media MS 10% makro-mikro, ditambah dengan vitamin, mio-inositol, dan BAP 0,2 ppm (hormon pertumbuhan), menghasilkan pertumbuhan yang paling baik.

Pada minggu kedua telah memperlihatkan pertumbuhan akar batang, dan daun. Minggu ketiga sudah terlihat menghasilkan pertumbuhan yang sempurna karena sudah tampak tanaman baru yang lengkap yang terdiri dari akar, batang dan daun. Minggu keempat daun sudah terbentuk dengan sempurna dan sudah dapat digunakan sebagai eksplan.

Inisiasi kalus. Eksplan (daun) yang berasal dari tanaman steril ditanam pada media perlakuan yaitu pertumbuhan 2,0 ppm 2,4 D dan 1,0 ppm BAP. Pada minggu kedua sudah mulai terbentuk kalus dan pertumbuhan kalus yang sempurna terjadi pada minggu kedelapan. Penggunaan hormon 2,4 D sangat berguna untuk menghambat proses morfogenesis pada kalus sehingga mampu menginisiasi pertumbuhan kalus. Pada minggu keenam kalus sudah dapat digunakan untuk perbanyakkan dengan cara disubkulturkan.

Perbanyakkan kalus. Perbanyakkan dilakukan dengan cara memindahkan kalus (minggu keenam) pada media yang sama dengan media pertumbuhan yang optimal yaitu media MS 10% dengan penambahan 2,0 ppm 2,4 D dan 1,0 BAP (sub kultur) beberapa kali sehingga diperoleh jumlah kalus lebih banyak lagi. Pada minggu kedelapan jumlah kalus sudah banyak dan dapat digunakan untuk pengujian.

Penapisan fitokimia. Penapisan ini dilakukan terhadap kalus yang telah dikeringkan dengan cara diangin-anginkan dan serbuk kering daun mahkota dewa sebagai pembanding. Hasil uji penapisan fitokimia menunjukkan bahwa golongan metabolit sekunder yang dihasilkan kalus mempunyai kesamaan dengan metabolit sekunder yang dihasilkan oleh

serbuk daun mahkota dewa yaitu golongan alkaloid, saponin, flavonoid, tannin, dan steroid/triterpenoid. Sedangkan golongan kumarin tidak ditemukan pada kalus tetapi ditemukan pada serbuk kering daun (Tabel 1).

KLT. Dari data kromatogram terlihat ada perbedaan kandungan antara ekstrak daun dan ekstrak kalus yaitu dari jumlah dan warna bercak yang terbentuk. Jumlah bercak dari ekstrak daun lebih banyak dari pada yang ditemukan pada ekstrak kalus.

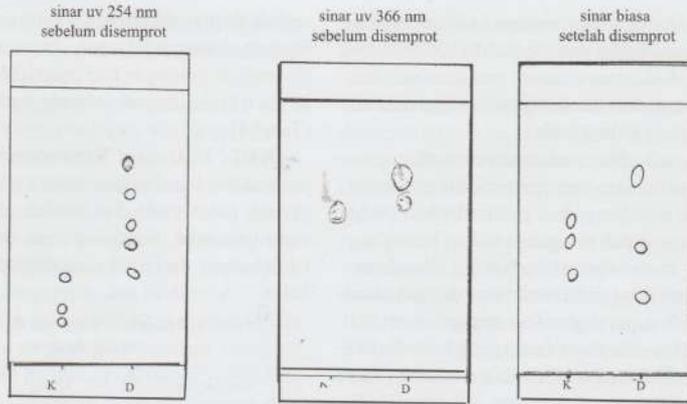
Tabel 1. Penapisan fitokimia daun dan kalus mahkota dewa

Golongan	Daun	Kalus
Alkaloid	+	+
Flavonoid	+	+
Saponin	+	+
Tanin	+	+
Kumarin	+	-
Steroid / triterpenoid	+	+

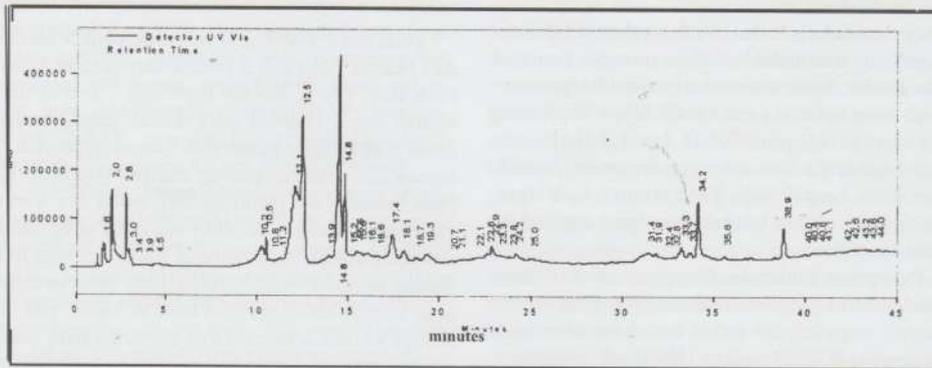
Pada sinar UV λ 254 nm diperoleh 5 bercak dari ekstrak daun dan 3 bercak dari ekstrak kalus. Pada sinar UV λ 366 nm diperoleh 2 bercak dari ekstrak daun, 1 bercak dari ekstrak kalus, setelah disemprot dengan penampak bercak diperoleh 3 bercak dari masing-masing ekstrak (Gambar 1). Pada bercak yang memiliki hRf sama dan warna yang sama diduga memiliki senyawa yang sama dan pada bercak yang berbeda warna maupun hRf diduga senyawa yang berbeda baik yang terdapat pada ekstrak daun maupun ekstrak kalus. Hal ini diduga karena terbentuknya senyawa baru pada proses pembentukan kalus, dan belum sepenuhnya terbentuk senyawa yang terdapat pada daun karena kalus belum membentuk difrensiasi menjadi tanaman yang utuh (Tabel 2).

Tabel 2. Penapisan fitokimia daun dan kalus mahkota dewa

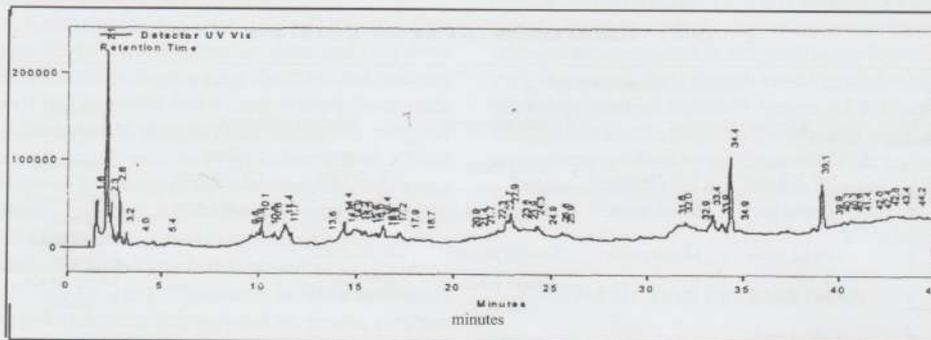
No Bercak	Daun			Kalus		
	Sebelum disemprot		Setelah disemprot	Sebelum disemprot		Setelah disemprot
	Sinar UV 254 nm	Sinar UV 366nm	Sinar biasa	Sinar UV 254 nm	Sinar UV 366 nm	Sinar biasa
1	Coklat tua	Merah muda	Hijau muda	Coklat tua	Merah muda	Merah muda pucat
2	Coklat muda	Merah muda	Kuning jingga	Coklat muda		Merah muda pucat
3	Coklat muda		Merah muda pucat	Coklat muda		Merah muda pucat
4	Coklat muda					
5	Coklat muda					



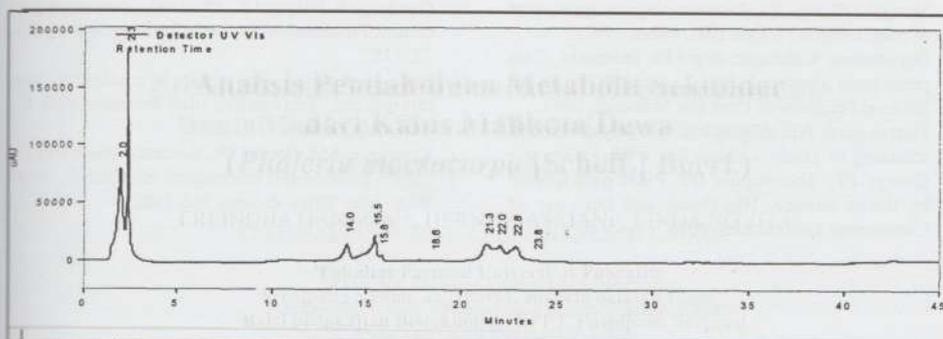
Gambar 1. Kromatogram KLT ekstrak metanol daun dan kalus mahkota dewa. K: kalus, D: daun, fase gerak : metanol-etil asetat-isopropanol (1:2:17), penampak bercak: anisaldehyd-asam sulfat pekat



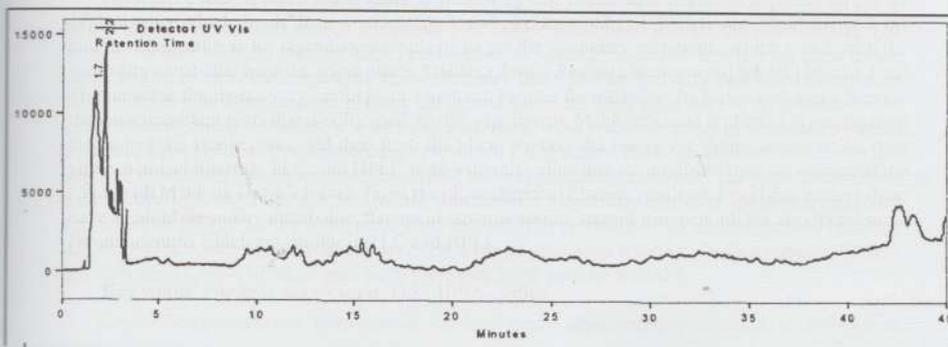
Gambar 2. Profil kromatogram KCKT ekstrak metanol daun mahkota dewa $\lambda = 230$ nm.



Gambar 3. Profil kromatogram KCKT ekstrak metanol kalus mahkota dewa $\lambda = 230$ nm.



Gambar 4. Profil kromatogram hasil KCKT ekstrak metanol daun mahkota dewa $\lambda = 366$ nm.



Gambar 5. Profil kromatogram hasil KCKT ekstrak metanol kalus mahkota dewa $\lambda = 366$ nm.

KCKT. Profil kromatogram dari ekstrak daun dan ekstrak kalus pada λ 230 nm diperoleh jumlah puncak yang berbeda. Profil kromatogram dari ekstrak daun dan ekstrak kalus pada λ 360 nm, diperoleh hasil yang hampir sama dengan profil sebelumnya, yaitu ada perbedaan profil kromatogram tetapi dengan adanya perbedaan itu tidak menutup kemungkinan ada senyawa yang sama karena pada beberapa *retention time* memberikan puncak yang sama walau tinggi puncaknya sedikit berbeda. Hal ini mungkin disebabkan dari konsentrasi senyawa yang tidak sama (Gambar 2,3,4,5).

SIMPULAN

Hasil uji penapisan fitokimia dari daun dan kalus mahkota dewa menunjukkan bahwa keduanya mengandung metabolit sekunder yang sama yaitu golongan alkaloid, flavonoid, saponin, tannin, steroid /triterpenoid.

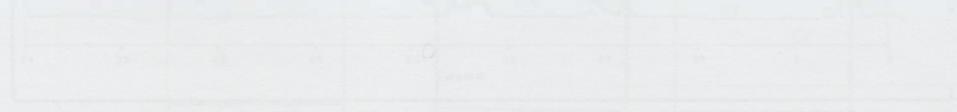
Hasil KLT dan KCKT memberikan bercak dan puncak sedikit berbeda, tetapi tidak sepenuhnya

berbeda karena masih menunjukkan beberapa persamaan. Sehingga diduga kalus dari mahkota dewa dapat menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang sama dengan daun dari tanaman asalnya.

DAFTAR PUSTAKA

1. Wetherell DF. Pengantar propagasi tanaman secara in vitro. New Jersey: Avery Publishing Inc; 1989.
2. Hendaryono DPS, Wijayani A. Teknik kultur jaringan: pengenalan dan petunjuk perbanyakan tanaman secara vegetatif modern. Yogyakarta: Kanisius; 1994.
3. Harmanto Ning. Mahkota Dewa (Revisi), obat pusaka para dewa. Jakarta: AgroMedia Pustaka; 2003. hal 1,7-11,15- 20.
4. Winarto WP. Mahkota Dewa: budi daya dan pemanfaatan untuk obat, Seri Agrisehat. Jakarta: Penebar Swadaya.2003. hal 1-11, 17-20, 55.
5. Perry ML A New species of Phaleria (Thymelaceae) from New Guinea, Vol XXXIX Cambridge, Mass: Journal of The Arnold Arboretum of Harvard University; 1958.

6. Shargol DP, Ngo TT. Biotechnological application of plant cultures. Tokyo: CRC Press; 1994.
7. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Cara pembuatan simplisia. Jilid 1. Jakarta: Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan; 1983.
8. Farnsworth NR. Biological and phytochemical screening of plants. J Pharm Sci. 1966; 55(3).
9. George FE, Sherrington DP. Plant propagation by tissue culture. Handbook and Directory of Commercial Laboratories; 1984.
10. Gamborg OI, Phillips GC. Plant cell, tissue and organ culture. Fundamental methods, Springer. 2004. p.67-72, 315.
11. Stahl E. Analisis obat secara kromatografi dan mikroskopi. Terjemahan oleh Padmawinata K. Bandung: Penerbit ITB; 1985.
12. Krstolovic AM, Brown PR. Reversed phase HPLC: theory, practice and biochemical Application. New York: John Wiley. & Sons. Inc; 1982.



ABSTRAK
 Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kandungan senyawa aktif dalam ekstrak tumbuhan obat yang digunakan sebagai bahan baku pembuatan simplisia. Sampel ekstrak tumbuhan obat yang digunakan adalah ekstrak tumbuhan obat yang telah diidentifikasi sebelumnya. Analisis dilakukan menggunakan metode kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) dengan kolom fase terbalik (RP-C18). Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak tumbuhan obat mengandung senyawa aktif yang dapat diidentifikasi dengan menggunakan metode KCKT. Senyawa aktif yang teridentifikasi adalah senyawa golongan flavonoid, alkaloid, dan terpenoid. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi yang berguna bagi pengembangan simplisia yang berkualitas tinggi.

DAFTAR PUSTAKA
 1. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Cara pembuatan simplisia. Jilid 1. Jakarta: Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan; 1983.
 2. Farnsworth NR. Biological and phytochemical screening of plants. J Pharm Sci. 1966; 55(3).
 3. George FE, Sherrington DP. Plant propagation by tissue culture. Handbook and Directory of Commercial Laboratories; 1984.
 4. Gamborg OI, Phillips GC. Plant cell, tissue and organ culture. Fundamental methods, Springer. 2004. p.67-72, 315.
 5. Stahl E. Analisis obat secara kromatografi dan mikroskopi. Terjemahan oleh Padmawinata K. Bandung: Penerbit ITB; 1985.
 6. Krstolovic AM, Brown PR. Reversed phase HPLC: theory, practice and biochemical Application. New York: John Wiley. & Sons. Inc; 1982.