

25

**LAPORAN
PENELITIAN DASAR
UNGGULAN PERGURUAN TINGGI**



**OPTIMALISASI PRODUKSI MELALUI KULTUR JARINGAN, ISOLASI
DAN KARAKTERISASI SENYAWA BIOAKTIF DAUN TAPAK LIMAN
(ELEPHANTOPUS SCABER)**

OLEH:

**Dr. Yuliani, M.Si.
Dr. Fida Rachmadiarti, M.Kes.
Sari Kusuma Dewi, S.Si., M.Si.**

**NIDN. 0021076801
NIDN. 0018026504
NIDN. 0005058309**

**DIBIAYAI OLEH :
DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
SESUAI DENGAN :
KONTRAK PENELITIAN NOMOR: 000001.20/UN38.11-P/LT/2018**

**LAPORAN
PENELITIAN DASAR
UNGGULAN PERGURUAN TINGGI**



**OPTIMALISASI PRODUKSI MELALUI KULTUR JARINGAN, ISOLASI
DAN KARAKTERISASI SENYAWA BIOAKTIF DAUN TAPAK LIMAN
(ELEPHANTOPUS SCABER)**

OLEH:

**Dr. Yuliani, M.Si.
Dr. Fida Rachmadiarti, M.Kes.
Sari Kusuma Dewi, S.Si., M.Si.**

**NIDN. 0021076801
NIDN. 0018026504
NIDN. 0005058309**

**DIBIAYAI OLEH :
DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
SESUAI DENGAN :
KONTRAK PENELITIAN NOMOR: 000001.20/UN38.11-P/LT/2018**

HALAMAN PENGESAHAN

Judul : OPTIMALISASI PRODUKSI MELALUI KULTUR JARINGAN, ISOLASI DAN KARAKTERISASI SENYAWA BIOAKTIF DAUN TAPAK LIMAN (Elephantopus scaber)

Peneliti/Pelaksana
Nama Lengkap : Dr. Dra YULIANI, M.Si
Perguruan Tinggi : Universitas Negeri Surabaya
NIDN : 0021076801
Jabatan Fungsional : Lektor Kepala
Program Studi : Pendidikan Biologi
Nomor HP : 08123188703
Alamat surel (e-mail) : yuliani@unesa.ac.id

Anggota (1)
Nama Lengkap : Dr. Dra FIDA RACHMADIARTI M.Kes
NIDN : 0018026504
Perguruan Tinggi : Universitas Negeri Surabaya

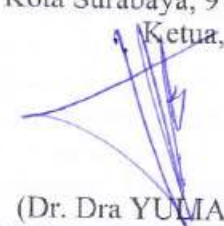
Anggota (2)
Nama Lengkap : SARI KUSUMA DEWI S.Si, M.Si
NIDN : 0005058309
Perguruan Tinggi : Universitas Negeri Surabaya

Institusi Mitra (jika ada)
Nama Institusi Mitra : -
Alamat : -
Penanggung Jawab : -
Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 1 dari rencana 3 tahun
Biaya Tahun Berjalan : Rp 63,000,000
Biaya Keseluruhan : Rp 243,000,000

Mengetahui,
Dekan FMIPA Unesa

(Prof. Dr. Suyono, M.Pd.)
NIP/NIK 196006201985031003

Kota Surabaya, 9 - 11 - 2018

Ketua,

(Dr. Dra YULIANI, M.Si)
NIP/NIK 196807211993032002

Menyetujui,
Ketua LPPM Unesa

(Prof. Amin Lestari, M.A., M.Pd.)
NIP/NIK 196102121988032004

**OPTIMALISASI PRODUKSI MELALUI KULTUR JARINGAN, ISOLASI DAN
KARAKTERISASI SENYAWA BIOAKTIF DAUN TAPAK LIMAN
(*Elephantopus scaber*)**

• **RINGKASAN**

Elephantopus scaber merupakan famili Asteraceae yang sudah diketahui potensinya sebagai tanaman biopestisida, walaupun demikian untuk digunakan dalam skala yang besar akan dibutuhkan daun *E.scaber* dalam jumlah yang banyak, sebagai perbandingan dari 1 kg daun tanaman *E.scaber* akan diperoleh ekstrak methanol sebesar 25 gram, karena itu dalam penelitian ini diupayakan mendapatkan senyawa bio aktif dari daun *E.Scaber* melalui teknik kultur jaringan dengan penambahan elisitor dalam media kulturnya. Penelitian ini bertujuan untuk 1) Optimalisasi /perbanyak senyawa metabolit sekunder daun *Elephantopus scaber* melalui teknik kultur jaringan dengan penambahan elisitor, 2) Isolasi senyawa bio aktif (fenol) yang terdapat dalam ekstrak daun *Elephantopus scaber*, 3) mengidentifikasi karakteristik senyawa bio aktif yang terdapat di dalamnya, 4) Uji coba bioaktivitas senyawa hasil isolasi terhadap hewan uji secara in vitro, 5) Analisis kandungan protein pada hewan uji. Penelitian dirancang dengan tahapan sebagai berikut: Tahun pertama terdiri dari tahap 1. Tahun kedua terdiri dari tahap 2 dan 3, dan Tahun ketiga terdiri dari tahap 4 dan 5. Penelitian ini diharapkan dapat mendukung ketercapaian dua topik riset unggulan perguruan tinggi yaitu perubahan iklim dan pelestarian lingkungan, dan ketahanan pangan, sesuai Renstra Unesa 2015-2019 serta riset unggulan yang tercantum dalam RIP Unesa 2016-2020. Tahap penelitian meliputi:

Tahun pertama dilakukan sebagai berikut: Mendiskripsikan tanaman *E.Scaber* secara morfologi, anatomi dan fisiologi. Eksplan Daun *Elephantopus scaber* yang diperoleh dari daerah dataran menengah ditumbuhkan dengan teknik kultur jaringan menggunakan penambahan elisitor sampai terjadi kalus. Dalam proses ini dilakukan uji coba penambahan jenis elisitor pada media kultur untuk mendapatkan kalus yang mengandung hasil/produksi senyawa bioaktif yang terbaik. Pada tahun pertama selain diperoleh senyawa metabolit sekunder daun *E.scaber* juga diperoleh metode perbanyakan yang paling optimal.

Tahun kedua dilakukan teknik isolasi dengan menggunakan metode maserasi, partisi, kromatografi kolom vakum, dan kromatografi kolom gravitasi. Senyawa murni setelah diisolasi akan diidentifikasi karakteristiknya dengan spektrofotometer UV-Vis, FTIR, dan spektrometri NMR. Pada tahap kedua ini akan diperoleh senyawa murni dari daun *E.scaber*.

Tahun ketiga penelitian adalah Uji bioaktivitas, senyawa uji yang diperoleh dari isolasi diperlakukan ke hewan uji untuk melihat keefektifan hasil senyawa murni dalam mengendalikan hama dalam skala laboratorium, mengukur total protein hewan uji dan menghasilkan paten untuk senyawa yang dihasilkan. Jurnal yang menjadi target dalam penelitian ini adalah Journal of Agricultural Science and Technology.

Hasil penelitian Tahun pertama menunjukkan bahwa tanaman *Elephantopus scaber* yang hidup pada dataran sedang mempunyai karakter morfologi yaitu rerata luas daun = 25,78 cm², panjang pelepah daun = 1,86 cm dan tinggi tanaman sebesar 3,66 cm, mempunyai ciri trikoma non glandular yang berbentuk jarum; mempunyai kandungan senyawa metabolit sekunder yaitu senyawa flavonoid, saponin, fenol dan triterpenoid, yang bisa digunakan sebagai tanaman obat atau biopestisida. Sumber eksplan yang terbaik terdapat pada tulang daun yang menunjukkan 11 tanaman hidup pada dua minggu setelah tanam. Diperoleh kalus pada eksplan daun dan tulang daun setelah 1,5 bulan tanam. Pertumbuhan kalus menunjukkan bahwa biomassa kalus sebesar 0,5305 berwarna hijau dan remah. Daun *E scaber* mempunyai kadar fenol sebesar 0,208 mg/ml dan flavonoid sebesar 0,010 mg/ml.

Key words : Optimalisasi, Isolasi, Karakterisasi, Senyawa bio aktif, daun *Elephantopus scaber*.

**THE OPTIMIZATION OF PRODUCTION THROUGH TISSUE CULTURE,
ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS
OF TAPAK LIMAN LEAF (*Elephantopus scaber*)**

ABSTRACT

Elephantopus scaber is a family of Asteraceae which has been known as a potential biopesticide plant, however to be used on a large scale it will required *E.scaber* leaves in large quantities, as a comparison of 1 kg of leaves of *E.scaber* plants will be obtained methanol extract of 25 grams, therefore in this study sought to obtain bio-active compounds from leaves of *E.caber* through tissue culture techniques with the addition of elicitors in their culture media. This study aims to 1) Optimization of secondary metabolites of leaves of *E.scaber* through tissue culture techniques with the addition of elicitor, 2) Isolation of bioactive compounds (phenols) contained in leaf extract, 3) identify the characteristics of bioactive compounds found in *E. scaber*, 4) Trial of bioactivity by isolated of compounds against using animals in vitro test, 5) Analysis of protein content in animals. The research was designed with the following stages: The first year consisted of 1 stage, while the second year consisted of stages 2 and 3, and the third year consisted of stages 4 and 5. This research is expected to support the achievement of two top research topics in universities namely climate changes, conservation environment, and food security, according to the 2015-2019 Unesa Strategic Plan and superior research listed in the 2016-2020 Unesa RIP. The research phase included:

The first year is carried out as follows: Describing the *E.caber* plants morphologically, anatomy and physiology. Leaf Explants of *E.scaber* obtained from the middle plains area are grown by tissue culture techniques using the addition of elicitor to callus. In this trial process of the addition elicitor types on culture media were carried out to obtain callus containing the best results/ production of bioactive compounds. In the first year, in addition to the secondary metabolites of *E.scaber* leaves, the most optimal method of multiplication was obtained.

The second year was carried out isolation techniques using maceration, partitioning, vacuum column chromatography, and gravity column chromatography. The pure compounds after being isolated will be identified by using UV-Vis spectrophotometer, FTIR, and NMR spectrometry. In this second stage, pure compounds from *E.scaber* leaves will be obtained.

The third year was bioactivity testing, the test compounds obtained from isolation were treated to test animals to see the effectiveness of the results of pure compounds in controlling pests on a laboratory scale, measuring the total protein of animals' test and producing patents for the compounds produced. The journal was targeted in this study was the Journal of Agricultural Science and Technology.

The results of the first year showed that *E.scaber* plants that lived in the temperate plains had morphological characters, namely the average leaf area = 25.78 cm², mid length leaf = 1.86 cm and plant height of 3.66 cm, had a non-glandular trichome characteristic needle-shaped; has secondary metabolite compounds, namely flavonoids, saponins, phenols and triterpenoids, which can be used as medicinal plants or biopesticides. The best explant sources are in the leaf bone which shows 11 live plants two weeks after planting. Callus obtained from leaf explants and leaf bones after 1.5 months of planting. Callus growth shows that callus biomass of 0.5305 is green and crumbs. *E scaber* leaves have phenol content of 0.208 mg / ml and flavonoids of 0.010 mg / ml.

Key words: Optimization, Isolation, Characterization, Bio-active compounds, *Elephantopus scaber* leaves.

PRAKATA

Puji syukur kepada Allah SWT atas berkah rahmat dan hidayah-Nya maka Laporan Penelitian dengan Judul “Optimalisasi Produksi melalui Kultur Jaringan, Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Bioaktif Daun Tapak Liman (*Elephantopus scaber*)” telah terselesaikan dengan baik.

Laporan penelitian ini disusun dalam rangka memenuhi persyaratan hibah Penelitian Dasar Unggulan Perguruan Tinggi (PDUPT). Dalam kesempatan ini peneliti menyampaikan terima kasih kepada Kemenristek (DRPM) yang telah membantu pendanaan sehingga penelitian ini dapat dilaksanakan. Peneliti juga menyampaikan terima kasih kepada :

1. Prof. Dr. Nurhasan. selaku Rektor UNESA yang memberikan sarana dalam penelitian ini.
2. Prof. Lies Amin Lestari, M.A., M.Pd. selaku Ketua LPPM UNESA yang telah mengkoordinasikan penelitian-penelitian di UNESA.
3. Rekan-rekan Jurusan Biologi FMIPA UNESA yang telah membantu penelitian baik secara langsung maupun tidak langsung
4. Mahasiswa Jurusan Biologi yang telah membantu penelitian Kultur Jaringan

Kami menyadari penelitian ini belum sempurna, karena itu masih diperlukan penelitian lanjutan. Semoga hasil penelitian ini dapat bermanfaat bagi yang memerlukan.

Surabaya, 9 November 2018

Peneliti

DAFTAR ISI

	halaman
HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
RINGKASAN	iii
PRAKATA	v
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR TABEL	vii
DAFTAR GAMBAR	viii
DAFTAR LAMPIRAN	ix
BAB 1. PENDAHULUAN	
A. Latar Belakang	1
B. Permasalahan yang akan diteliti	3
C. Tujuan Penelitian	4
D. Urgensi penelitian	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	
A. State of The Art Penelitian	6
B. Senyawa Metabolit Sekunder pada Tumbuhan dan Fungsinya sebagai Pestisida Nabati	6
C. <i>Elephantopus scaber</i> yang Digunakan sebagai Biopestisida	7
D. Isolasi dan Karakterisasi	7
E. Penambahan Elisitor dan Produksi metabolit Sekunder melalui Kultur Jaringan	8
F. Road map Penelitian	9
BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	11
BAB IV. METODE PENELITIAN	
A. Jenis penelitian	12
B. Prosedur dan parameter penelitian	13
C. Rancangan penelitian	14
D. Analisis Data	14
E. Luaran	14
BAB IV. HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI	15
BAB V. RENCANA TAHAP BERIKUTNYA	34
BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN	35
DAFTAR PUSTAKA	36
LAMPIRAN	38

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 5.1 Rerata luas daun pada tanaman <i>E. scaber</i>	16
Tabel 5.2 Rerata panjang pelepah daun tanaman <i>E.scaber</i>	17
Tabel 5.3 Rerata tinggi tanaman	18
Tabel 5.4 Pengamatan morfologi trikoma pada tanaman <i>Elephantus scaber</i>	19
Tabel 5.5 Penampang anatomi trikoma pada tanaman <i>Elephantus scaber</i>	21
Tabel 5.6 Hasil uji fitokimia ekstrak methanol tumbuhan <i>E. scaber</i>	23
Tabel 5.7 Jumlah kultur eksplan daun tanaman tapak liman dengan perlakuan penambahan ZPT, 2,4 D, BAP	24
Tabel 5.8 Jumlah kultur eksplan daun tanaman tapak liman dengan perlakuan penambahan ZPT pada 2 MST	26
Tabel 5.9 Jumlah kultur eksplan pelepah daun, tulang daun tanaman tapak liman dengan perlakuan penambahan ZPT pada 2 minggu setelah tanaman (MST)	28
Tabel 5.10 Rerata biomassa basah kalus (g) setelah 8 minggu setelah tanam	30
Tabel 5.11 Kadar senyawa fenol dan flavonoid ekstrak methanol daun Tapak Liman	30

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 4.1 Bagan alir penelitian sesuai dengan Renstra/RIP Unesa	12
Gambar 4.2 Bagan skematis prosedur dan luaran penelitian	15
Gambar 5.1 (a) eksplan yang tumbuh baik berwarna hijau, (b) eksplan yang terkontaminasi Jamur, (c) eksplan yang terkontaminasi bakteri (dokumentasi pribadi)	25
Gambar 5.2 Pertumbuhan kalus dalam 1,5 bulan	29
Gambar 5.3 pertumbuhan kalus dalam 2 bulan	29

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Bukti Artikel di Jurnal Terindex scopus	38
Lampiran 2. Bukti sertifikat seminar international	53
Lampiran 3. Bukti artikel yang akan terbit di proseding terindex scopus	55
Lampiran 4. Bukti Produk kalus	62
Lampiran 5. Draft Buku Ajar	63
Lampiran 6. Dokumentasi penelitian	64

BAB I. PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Biopestisida atau senyawa bioaktif yang berasal dari tumbuhan telah dikembangkan karena lebih aman dan ramah bagi lingkungan dan tidak membunuh organisme non target. Selain menghasilkan senyawa primer dalam metabolismenya, tumbuhan juga menghasilkan senyawa metabolit sekunder yaitu senyawa fenolik, alkaloid, terpenoid, dan senyawa sulfur. Senyawa metabolit sekunder ini merupakan pertahanan tumbuhan terhadap serangan hama (Rukmana dan Oesman, 2002; Altieri dan Altieri, 2004). Dalam 30 tahun terakhir, tidak kurang dari 1500 tanaman telah dilaporkan aktif terhadap serangga, atau berpengaruh buruk terhadap organisme pengganggu tanaman.

Berbagai penelitian telah dilakukan untuk memanfaatkan senyawa metabolit sekunder sebagai biopestisida. Salah satunya dari famili Asteraceae yaitu *Elephantopus scaber* atau tapak liman. *E.scaber* merupakan tumbuhan obat dan mempunyai kandungan kimia yang meliputi flavonoid (daun-ekstrak metanol), fenol (daun-rhizoma ekstrak methanol), saponin (rhizoma-ekstrak metanol), steroid (daun-rhizoma ekstrak metanol dan kloroform), tanin (daun-ekstrak kloroform dan metanol), terpen (daun, rhizoma-ekstrak metanol dan kloroform), triterpenoid, sesquiterpen lacton, elephantopin, selain itu juga mengandung epifriedelinol, lupeol, stigmasterol, triacontan-1-ol, dotria-contan-1-ol, lupeolacetate, deoxyelephantopin, isodeoxyelephantopin, dan luteolin-7-glucosida, yang berperan sebagai anti mikroba dan ionsektisida (Mohan *et al.*, 2010).

Penelitian sebelumnya (Yuliani, 2013), telah mengembangkan biopestisida dari famili Asteraceae yaitu tanaman *Elephantopus scaber* (tapak liman), *Ageratum conyzoides* (babandotan), dan *Pluchea indica* (beluntas), hasilnya menunjukkan bahwa tanaman *E.scaber* yang diperoleh dari dataran menengah merupakan tanaman yang paling optimal untuk biopestisida. Konsentrasi ekstrak daun tanaman tapak liman sebesar 4 dan 6 % mampu secara efektif mematikan *Spodoptera litura* sebesar 90 % dan mortalitas *Plutela xylostella* sebesar 83,3-100%. Biopestisida yang dikembangkan juga dicobakan ke cacing tanah dan dampak biopestida dari ekstrak methanol tanaman tapak liman terhadap cacing tanah hanya mematikan cacing tanah sebesar 26,6-33,3% pada pengamatan hari ke sepuluh (Yuliani dan Lisdiana, 2015). Biopestisida yang dikembangkan

berdasarkan ekstrak daun methanol tanaman *E. scaber* juga menunjukkan tidak terjadi penurunan struktur komunitas mikroba di agroekosistem sawah (Yuliani dan Lisdiana, 2016). Hal tersebut menunjukkan bahwa *E.scaber* layak untuk dijadikan sebagai biopestisida dan dikembangkan dalam skala industri.

Walaupun demikian untuk bisa dikembangkan sebagai skala industri, maka diperlukan daun *E.scaber* dalam jumlah yang besar. Sebagai gambaran dari 1 kg basah daun setelah dikeringkan hanya menjadi 200 gram dan semakin berkurang ketika di ekstrak (25 gram). Oleh karena itu diperlukan teknik yang lain untuk memperbanyak senyawa metabolit sekunder tanaman, yaitu dengan teknik kultur jaringan.

Perbanyak dengan teknik kultur jaringan melalui pembentukan kalus selain dapat digunakan untuk produksi bibit, dapat pula digunakan untuk memproduksi senyawa-senyawa kimia hasil metabolisme sekunder. Pembentukan senyawa tersebut dapat terjadi berdasarkan totipotensi biokimia, dimana suatu sel tumbuhan mempunyai potensi genetik yang diturunkan untuk menghasilkan senyawa yang sama dalam jumlah besar jika ditumbuhkan dalam kondisi *in vitro*. Senyawa metabolit sekunder tersebut diperoleh dengan cara mengekstrak kalus yang diperoleh dari eksplan. Di sisi lain produksi metabolit sekunder atau senyawa bioaktif dari tumbuhan dapat ditingkatkan, dengan cara merubah komposisi media dan lingkungan sel. Salah satunya dengan menambah elisitor. Elisitasi merupakan salah satu cara yang paling efektif untuk meningkatkan produksi senyawa metabolit sekunder (Roberts dan Shuler, 1997). Setelah diproduksi dalam skala besar maka senyawa bioaktif akan di isolasi dan di karakteristik sehingga diperoleh senyawa aktif yang berperan (tahun pertama penelitian).

Hasil penelitian tahun pertama menunjukkan *E.Scaber* merupakan tanaman yang berpotensi untuk dikembangkan dalam kultur jaringan untuk di isolasi senyawanya. Walaupun sebagai sumber eksplan, tanaman *E. scaber* ternyata sulit untuk di kultur, karena keberadaan trikoma yang terdapat di batang, pelepah daun, bahkan daun *E.Scaber*. Hasil penelitian morfologi *E. scaber* yang hidup pada dataran sedang mempunyai karakter morfologi yaitu rerata luas daun = $25,78 \text{ cm}^2$, panjang pelepah daun= 1,86 cm dan tinggi tanaman sebesar 3,66 cm. Secara anatomi mempunyai ciri trikoma non glandular yang berbentuk jarum, dan secara fisiologi mempunyai senyawa flavonoid, saponin, fenol dan triterpenoid. Sumber eksplan yang terbaik terdapat pada tulang daun yang menunjukkan 11 tanaman hidup pada dua minggu setelah tanam. Diperoleh kalus pada eksplan daun dan tulang daun setelah 1,5 bulan tanam. Pertumbuhan kalus yang

diperoleh dari eksplan tulang daun menunjukkan bahwa biomassa kalus sebesar 0,5305 berwarna hijau dan remah. Daun *E. scaber* mempunyai kadar fenol sebesar 0,208 mg/ml dan flavonoid sebesar 0,010 mg/ml.

Berdasarkan hasil pada tahun pertama maka kalus yang diperoleh dalam penelitian ini akan di optimalisasi, di isolasi, dan diidentifikasi senyawa aktif yang diperoleh dari daun *Elephantopus scaber* (tahun kedua penelitian). Selain itu senyawa aktif yang diperoleh akan dikembangkan menjadi biopestisida dengan uji coba pada hama dan dampaknya terhadap kandungan protein dari hama *Spodoptera litura* (tahun ketiga penelitian). Diharapkan biopestisida yang dihasilkan dapat dikembangkan dalam skala industri, sehingga dalam jangka panjang dapat membantu menciptakan suatu ekosistem pertanian yang seimbang dan pertanian yang berkelanjutan. Penelitian yang akan dilakukan juga diharapkan akan memberikan kontribusi terhadap terwujudnya output program ipteksbud dalam Renstra Unesa (kompetensi keahlian/keilmuan MIPA/Kesehatan/dan olahraga), yaitu ketahanan pangan serta perubahan iklim dan pelestarian lingkungan.

B. Permasalahan penelitian yang akan dikaji dalam penelitian ini adalah:

1. Bagaimanakah karakteristik morfologi, anatomi dan fisiologi dari *E. scaber* yang menunjang sebagai sumber eksplan kultur jaringan?
2. Bagaimanakah optimalisasi produksi senyawa bio aktif dari kultur jaringan daun *E. scaber* melalui penambahan elisitor pada media kultur ditinjau dari pertumbuhan kalus dan senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan?
3. Apakah senyawa bio aktif yang terdapat dalam ekstrak daun *E. scaber* setelah dilakukan isolasi dan karakterisasi?
4. Bagaimanakah efektivitas biopestisida dari senyawa aktif yang dikembangkan dalam mengendalikan hama?
5. Bagaimanakah dampak Biopestisida *E. scaber* yang dikembangkan terhadap penurunan kandungan protein hewan uji?

Untuk tahun pertama, yang menjadi fokus dalam penelitian adalah menjawab permasalahan no. 1 dan 2, untuk tahun kedua menjawab permasalahan pada no. 3, sedangkan untuk menjawab permasalahan penelitian no. 4 dan 5 dilakukan pada penelitian tahun ketiga.

C. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengoptimalkan produksi, mengisolasi, dan karakterisasi senyawa bioaktif ekstrak daun *Elephantopus scaber*. Selain itu mengembangkan biopestisida dari senyawa aktif yang diperoleh untuk diterapkan pada hewan uji. Secara khusus penelitian ini bertujuan untuk :

1. Tahun pertama. Optimalisasi/perbanyak produksi senyawa metabolit sekunder daun *E. scaber* melalui teknik kultur jaringan dan penambahan elisitor, meliputi:
2. Tahun kedua. Isolasi dan Identifikasi senyawa aktif dari *Elephantopus scaber*, meliputi:
3. Tahun ketiga. Efektivitas biopestisida dari senyawa aktif yang dikembangkan dalam mengendalikan hama, meliputi :

D. Urgensi Penelitian

Keberadaan pestisida sintesis dapat meningkatkan resistensi hama, resurgensi hama, dan kematian organisme non target. Sehingga perlu dikembangkan penggunaan pestisida nabati yang berasal dari tumbuhan. Walaupun demikian pengembangan biopestisida haruslah diimbangi dengan kajian ilmiah untuk menentukan flora yang tepat, kemampuan mematikan hama tetapi tidak mengakibatkan mortalitas pada organisme non target, konsentrasi/dosis, frekuensi dan waktu aplikasi yang tepat, dan efek biopestisida terhadap pertumbuhan tanaman budidaya. Selain itu setelah diperoleh biopestisida yang teruji ilmiah, perlu dikembangkan secara industri, sehingga haruslah senyawa bioaktifnya diisolasi dan dikarakterisasi.

Penelitian yang sudah dilakukan terkait dengan biopestisida selama tahun 2011-2016 adalah 1) identifikasi flora lokal yang digunakan sebagai biopestisida oleh petani organik, 2) kajian senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh tumbuhan berdasarkan habitat, 3) tanaman Asteraceae yang memberikan hasil optimal sebagai biopestisida, 4) efek biopestisida terhadap organisme non target dan mikroba tanah. Penelitian Yuliani dan Lisdiana (2015), mengembangkan biopestisida dari tanaman *Elephantopus scaber* (tapak liman) yang efektif sebagai biopestisida. Konsentrasi ekstrak methanol daun tanaman tapak liman sebesar 4 dan 6 % mampu secara efektif mematikan *S. litura* sebesar 90 % dan *P. xylostella* sebesar 83,3-100%. Dampak biopestida dari ekstrak tanaman tapak liman terhadap organisme non target hanya mematikan cacing tanah (organisme non target) sebesar 26,6-33,3% pada pengamatan hari ke sepuluh.

Penelitian ini penting untuk dilakukan, karena diperlukan pengembangan biopestisida yang lebih lanjut, dengan mengisolasi dan mengkarakteristik senyawa bioaktif daun *E. scaber*, harapannya dapat diproduksi dalam skala industri sehingga nantinya dapat dipergunakan oleh masyarakat luas. Demikian pula bahan baku yang diperlukan untuk pembuatan biopestisida tidak perlu dalam jumlah yang besar (biasanya dari daun tanaman tapak liman dari 1 kg basah menjadi 200 g kering). Dengan tehnik kultur jaringan maka akan diperoleh senyawa bio aktif dalam jumlah yang lebih banyak, dalam waktu yang relative singkat, dan dengan potensi yang sama, sehingga dalam penelitian ini di tambahkan elisitor dalam media untuk memicu senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh tumbuhan. Senyawa bioaktif yang diperoleh melalui tehnik kultur jaringan akan di isolasi, dan di karakterisasi untuk mendapatkan senyawa murni yang siap diproduksi setelah di uji cobakan pada hewan uji. Temuan penelitian yang berupa biopestisida diharapkan dapat memperkaya IPTEK dalam mengatasi pencemaran Agroekosistem yang diakibatkan oleh penggunaan pestisida sintetik, dan menciptakan suatu ekosistem pertanian yang seimbang dan berkelanjutan.

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

A. *State of The Art Penelitian*

Penelitian yang diusulkan ini akan melengkapi penelitian sebelumnya di bidang pengendalian hayati pada Agroekosistem. Penelitian ini mempunyai peran dalam menunjang perkembangan IPTEK. Penelitian ini akan menambah kajian tentang peran elisitor dalam menstimulasi peningkatan produksi metabolit sekunder pada tumbuhan Asteraceae. Karena setiap tumbuhan mempunyai respon spesifik terhadap senyawa yang ditambahkan. Jenis elisitor dan konsentrasinya akan menambah wawasan di bidang ilmu kultur jaringan. Penelitian ini juga akan menambah khasanah terhadap metode kultur jaringan, metode isolasi dan ekstraksi. Melalui penelitian ini akan dikembangkan senyawa aktif yang diperoleh untuk diaplikasikan sebagai Biopestisida.

Penelitian dasar yang diusulkan ini juga menambah wawasan terhadap penelitian sejenis yang terkait dengan Biopestisida sehingga dapat menjadi sarana penelitian bagi peneliti lainnya. Keseimbangan Agroekosistem sangat diperlukan untuk menghasilkan produksi pertanian yang sehat, untuk itu diperlukan pestisida hayati yang dapat meminimalkan pencemaran lingkungan, yang mengendalikan hama sasaran tetapi tidak mematikan organisme non target dan tidak memberikan dampak pada struktur mikroba tanah. Biopestisida yang dikembangkan, dalam jangka panjang akan diproduksi secara luas, sehingga penelitian ini memperkaya metode optimalisasi produksi, isolasi dan karakterisasi senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh tumbuhan.

B. **Senyawa Metabolit sekunder pada tumbuhan dan fungsinya sebagai Pestisida Nabati**

Metabolit sekunder merupakan senyawa kimia yang terbentuk dalam tanaman. Senyawa metabolit sekunder dapat tersimpan pada organ tanaman seperti akar, batang, daun, rizoma, bunga dan biji (Wink: 2010). Metabolit sekunder merupakan senyawa kimia seperti alkaloid, flavonoid, kuinon, tanin, minyak atsiri, dan setiap senyawa saling bersinergis sehingga menambah efektivitasnya (Mazid, *et al.*, 2011). Metabolit sekunder diproduksi tanaman untuk pertahanan terhadap serangga (Pedigo, 1989). Senyawa fenol mempunyai kemampuan membentuk kompleks dengan protein melalui ikatan hidrogen, sehingga menghambat pembentukan protein dan asam nukleat (Harborne, 1987). Senyawa fenol juga dapat melarutkan lipid dari dinding sel yang dapat mempengaruhi integritas membran sitoplasma sehingga menyebabkan lisis sel, dan menghambat ikatan ATP-ase pada membran sel. Flavonoid merupakan senyawa yang bersifat racun, dan dapat

digunakan sebagai bahan aktif dalam pembuatan insektisida nabati. Flavonoid dapat bekerja sebagai inhibitor kuat pernapasan, dan antimikrobia (Robinson, 1995). Senyawa kumarin, fenol, terpenoid, polifenol, saponin, alkaloid mempunyai efek sebagai senyawa anti makan, dan hambatan pertumbuhan pada serangga yang akhirnya mengakibatkan larva mengalami toksisitas kronik dan mati (Lakshmanan *et al.*, 2012; Baskar *et al.*, 2010).

C. *Elephantopus scaber* yang digunakan sebagai Biopestisida

Elephantopus scaber tumbuh liar, dapat ditemukan dari dataran rendah sampai ketinggian 1300 meter dpl. Klasifikasi ilmiah meliputi Kingdom: Plantae; Superdivisio: Spermatophyta; Divisio: Magnoliopsida; Sub classis: Asteridae; Ordo: Asterales; Famili: Asteraceae; Genus: *Elephantopus*; Species: *Elephantopus scaber*.

Tapak liman mempunyai kandungan kimia yang meliputi flavonoid, fenol, saponin, steroid (daun-rhizoma), tanin, terpen, triterpenoid, sesquiterpen lacton, elephantopin; selain itu juga mengandung epifriedelinol, lupeol, stigmasterol, triacontan-1-ol, dotriacontan-1-ol, lupeolacetate, deoxyelephantopin, isodeoxyelephantopin, dan luteolin-7-glucosida, yang berperan sebagai anti mikroba (Mohan *et al.*, 2010). Pada ekstrak alkohol dan kloroform dari *E. scaber* ditemukan germacranolide (sesquiterpene lacton) yang toksik, dan pada ekstrak air bersifat sebagai analgesik, diuretik dan anti-inflamatori (Li *et al.*, 2004). Wan *et al.* (2009) menjelaskan daun dan akar *E. scaber* dalam ekstrak etanol berfungsi sebagai anti bakteri. Konsentrasi ekstrak methanol daun tanaman tapak liman sebesar 4 dan 6 % mampu secara efektif mematikan *S. litura* sebesar 90 % dan *P. xylostella* sebesar 83,3-100% (Yuliani dan Iisdiana, 2015).

D. Isolasi dan karakterisasi

Bahan tanaman terutama biji dan daun banyak mengandung lemak dan lilin yang bersifat sangat non polar dan dapat menimbulkan emulsi sehingga senyawa-senyawa tersebut perlu dipisahkan dari bahan tanaman, setelah itu dapat diekstrak dengan menggunakan bahan pelarut air, etanol, methanol, campuran alkohol berair atau dengan larutan alkohol berair yang diasamkan. Secara umum metode kromatografi menggunakan dua fasa, yaitu fasa tetap dan fasa bergerak (mobile). Kromatografi dibedakan berdasarkan sifat fasa tetap baik berupa zat padat atau zat cair. Empat macam metode kromatografi tersebut adalah : 1) Fasa bergerak zat cair, fasa tetap padat atau kromatografi serapan. Yang termasuk metode ini adalah kromatografi lapis tipis dan kromatografi penukar ion. 2) Fasa bergerak gas, fasa tetap padat. Yang termasuk metode ini adalah kromatografi gas padat. 3) Fasa bergerak zat cair, fasa tetap zat cair atau kromatografi partisi. Yang

termasuk metode ini adalah kromatografi kertas. 4) Fasa bergerak gas, fasa tetap zat cair. Yang termasuk metode ini adalah kromatografi kolom kapiler. Pemisahan kandungan tumbuhan dapat dilakukan dengan kromatografi kertas, kromatografi lapis tipis, kromatografi kolom, dan kromatografi zat cair. Dari metode ini kemudian diperoleh satu senyawa. Analisis senyawa dilakukan dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis, spektrometri IR dan spektrometri ¹H-NMR.

E. Produksi Metabolit Sekunder Melalui Penambahan Elisitor pada Kultur jaringan

Tingkat produksi metabolit sekunder dalam jaringan tumbuhan relatif rendah (kurang dari 1% berat kering tumbuhan) dan sangat tergantung pada kondisi fisiologis dan tahapan perkembangan tumbuhan (Yu *et al.*, 2003). Salah satu strategi untuk meningkatkan kandungannya melalui teknik kultur jaringan, yang dapat membentuk senyawa bioaktif dalam kondisi terkontrol dan dalam waktu yang relatif singkat (Abraham & Denis, 2015). Berdasarkan jenisnya, kultur jaringan tumbuhan dapat dikelompokkan menjadi kultur sel, kultur kalus, kultur suspensi, kultur embrio, kultur organ, kultur meristem, dan kultur protoplas. Pemilihan jenis kultur didasarkan pada tujuan yang ingin dicapai (Chawla, 2002). Untuk memproduksi metabolit sekunder biasa digunakan kultur suspensi dan kultur kalus (Mulabagal, 2004). Menurut Mulabagal (2004), tingkat produksi metabolit sekunder pada kultur kalus ternyata lebih tinggi jika dibandingkan dengan tingkat produksinya dalam tanaman aslinya. Jedinak *et al.*, (2004) juga melaporkan, bahwa produksi senyawa flavonoid melalui kultur jaringan lebih efektif menggunakan kultur kalus, karena dengan metode ini produksi glikosida dan aglikonnya lebih memungkinkan didapat untuk diperoleh.

Pemberian 20 M IBA dan 18 BA M menghasilkan kandungan metabolit sekunder asam grindelic pada *Grindelia purchella* yang relatif tinggi (1.85 mg/g berat kering) (Hernandez, 2005). Thanonkeo (2006) juga melaporkan, bahwa kultur organ batang dari tanaman *Pueraria candollei* pada media MS dengan penambahan zat pengatur tumbuh 4.5 M 2,4-D dan 0.46 M kinetin menghasilkan daidzein sebesar 5.12 mg/g berat kering dan genistein 2.77 mg/g berat kering. Pembentukan kalus sangat dipengaruhi oleh suplai hormon eksogen. Faktor lain yang mempengaruhi pembentukan kalus adalah genotip, kondisi fisiologis eksplan, komposisi nutrisi pada medium pertumbuhan, dan kandungan hormon endogen (Chawla, 2002).

Elisitasi merupakan salah satu cara yang paling efektif untuk meningkatkan produksi senyawa metabolit sekunder (Estrada *et al.*, 2016). Menurut Namdeo (2007), senyawa atau zat yang mempengaruhi diproduksinya fitoaleksin disebut elisitor, diperkuat oleh Estrada *et al.* (2016),

bahwa elisitor dapat menstimulasi pembentukan senyawa metabolit sekunder untuk melindungi sel dan seluruh bagian tumbuhan, walaupun elisitor juga dapat mendorong tumbuhan untuk mengaktifkan reaksi pertahanan yang lain. Terdapat dua macam elisitor yaitu elisitor biotik yang dapat berupa jamur, karbohidrat, protein atau lipid, dan elisitor abiotik dapat berasal dari senyawa anorganik, seperti ion logam dan deterjen (Robins, 1994).

Logam berat dalam bentuk garam lebih banyak digunakan sebagai elisitor abiotik karena cukup tersedia, mudah digunakan, murah dan lebih diketahui komponen kimianya jika dibandingkan dengan elisitor biotik. Namun, pemilihan jenis garam dan konsentrasi yang digunakan harus tepat karena efek toksisitas logam yang berlebihan justru akan menurunkan kandungan isoflavon (Angelova *et al.*, 2006). Tiap elisitor memberikan respon yang berbeda terhadap akumulasi isoflavon. Elisitor Co^{2+} mampu meningkatkan kandungan genistein lebih besar bila dibandingkan dengan daidzein, sedangkan elisitor Mn^{2+} menunjukkan respon akumulasi isoflavon yang sebaliknya. (Sukmaningrum, 2005).

Perlakuan elisitasi pada kultur suspensi sel *Azadirachta indica* A. Juss dengan menggunakan elisitor *S. Cerevisiae* dapat meningkatkan kandungan azadirachtin sebesar 200.07 % di dalam sel dan 256.73 % dalam media pada konsentrasi elisitor 0.05 % (b/v) (Sudirga, 2002). Hernandez *et al.* (2005) juga melaporkan, bahwa pemberian elisitor dimethylsulfoxide (DMSO) dapat menghasilkan kandungan asam grindelic pada tanaman *Grindelia pulchella* sebesar 1.85 mg/g berat kering. Perlakuan elisitasi pada kultur kalus akar *Gloriosa superba* dengan menggunakan elisitor ion logam Al^{3+} terbukti dapat meningkatkan kandungan kolkisin intraseluler pada akar sebanyak 63 kali lipat (Young dkk, 2006). Sedangkan pemberian elisitor ion logam Pb^{2+} dengan konsentrasi 5 mg/l dapat meningkatkan kandungan saponin pada kultur *Glycyrrhiza glabra* sebesar 250% dibandingkan kontrol (Tumova *et al.*, 2007). Mekanisme elisitasi terjadi karena ada pengikatan elisitor pada reseptor membran plasma, kemudian elisitor dikenali oleh sel tumbuhan sebagai senyawa kimia yang akan menginduksi respon fisiologis dan morfologis serta akumulasi fitoaleksin sebagai mekanisme pertahanan tumbuhan. (Radman, 2003).

F. Road map Penelitian

Penelitian mengenai senyawa metabolit sekunder tumbuhan sebagai biopestisida telah dilakukan dan hasil yang telah dicapai sebagai berikut: 1) Eksplorasi berbagai flora lokal yang dapat digunakan sebagai herbisida dan insektisida (2008-2013), penelitian tersebut antara lain penelitian senyawa alelokemi daun *Pluchea indica* sebagai herbisida (Yuliani, Evie R, Herlina F,

2008); penelitian tanaman umbi gadung, daun sirsak, tanaman anting-anting yang menunjukkan bahwa kombinasi ketiganya mampu mematikan (mortalitas) *Spodoptera litura* sebesar 82,96 % (Ningsih, Yuliani, Haryono, 2012); Penelitian penggunaan Ekstrak daun Suren dan Mahoni (Famili Meliaceae) menunjukkan bahwa Suren dengan konsentrasi ekstrak 10% mengakibatkan mortalitas ulat *Plutella xylostella* sebesar 85%, sedangkan mahoni dengan konsentrasi yang sama mengakibatkan mortalitas sebesar 64.17%. Hal ini menunjukkan walaupun dari famili yang sama tetapi efektifitasnya sebagai insektida berbeda (Hidayati, Yuliani, Nur K., 2013). 2) Penelitian berikutnya di fokuskan pada potensi tanaman Asteracea sebagai biopestisida dan hasilnya *Pluchea indica*, *Ageratum conyzoides* dan *Elephantopus scaber* dapat mengakibatkan mortalitas *spodoptera* sebesar 80 – 95 % (Yuliani,2013). Pada penelitian ini sudah diperoleh ekstrak, dosis dan frekuensi pemakaian untuk digunakan sebagai biopestisida. 3) pada tahun 2015-2016 (Yuliani dan Lisdiana) penelitian diarahkan kepada potensi *Elephantopus scaber* sebagai Biopestisida, dan diketahui pula dampaknya terhadap organisme non target, struktur mikroba tanah dan penurunan kandungan protein hama target. 4) **Penelitian PDUPT tahun pertama (2018)** diperoleh data morfologi, anatomi, fisiologi dan kalus dari daun *E. scaber* yang siap diisolasi

Penelitian Dasar Unggulan PT yang diusulkan kali ini juga sangat bersinergi dengan penelitian oleh tim sebelumnya. Pada penelitian tahun pertama diproduksi senyawa bioaktif melalui kultur jaringan sehingga akan diperoleh hasil metabolit sekunder dalam jumlah yang besar, untuk selanjutnya di isolasi dan di karakterisasi. Produk yang dihasilkan akan digunakan untuk mengembangkan biopestisida dalam skala yang lebih luas.

Perlunya riset ini dalam mendukung renstra penelitian Unesa adalah memberi sumbangan terlaksananya sebagian topik riset yang diunggulkan (dalam hal kompetensi MIPA), sehingga mendorong percepatan capaian renstra Unesa terutama di bidang pengembangan penelitian dasar, yang berupa **metode** atau **teori** yang baru sehingga peta jalan yang telah dibuat dapat dilanjutkan. Aspek penting lainnya adalah terbangunnya sinergi penelitian diantara tim-tim peneliti yang ada, yang nantinya dapat diperluas antar jurusan, fakultas bahkan kerjasama dengan Perguruan Tinggi lainnya. Peta jalan penelitian yang sudah jelas jalurnya, di masa mendatang, akan menghasilkan hasil riset yang bermutu dengan berbagai peneliti yang ahli di bidangnya sehingga diperoleh modal ilmiah berupa terwujudnya kemandirian di bidang penelitian dasar yang akan bermanfaat bagi pengembangan Unesa.

BAB III

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

A. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengoptimalkan produksi, mengisolasi, dan karakterisasi senyawa bioaktif ekstrak daun *Elephantopus scaber*. Selain itu mengembangkan biopestisida dari senyawa aktif yang diperoleh untuk diterapkan pada hewan uji. Secara khusus adalah:

1. Tahun pertama. Optimalisasi/perbanyak produksi senyawa metabolit sekunder daun *E. scaber* melalui teknik kultur jaringan dan penambahan elisitor, meliputi:
 - a. Melakukan eksperimen kultur jaringan daun *E. scaber* dengan penambahan elisitor
 - b. Menghitung pertumbuhan kalus (berat kalus) hasil kultur jaringan.
 - c. Mengukur senyawa metabolit sekunder hasil ekstrak daun dan kultur jaringan (kalus) *E. scaber*.
2. Tahun kedua. Isolasi dan Identifikasi senyawa aktif dari *Elephantopus scaber*, yaitu:
 - a. Mengisolasi senyawa bio aktif yang terdapat dalam kalus *E. scaber* hasil kultur jaringan.
 - b. Mengidentifikasi karakteristik senyawa fenol yang terdapat di dalamnya,
3. Tahun ketiga. Efektivitas biopestisida dari senyawa aktif yang dikembangkan dalam mengendalikan hama, meliputi :
 - a. Melakukan Uji coba bioaktivitas senyawa murni hasil isolasi dari kultur jaringan terhadap hewan uji pada skala laboratorium.
 - b. Mengukur total protein dari hewan uji
 - c. menghasilkan paten untuk senyawa murni hasil isolasi

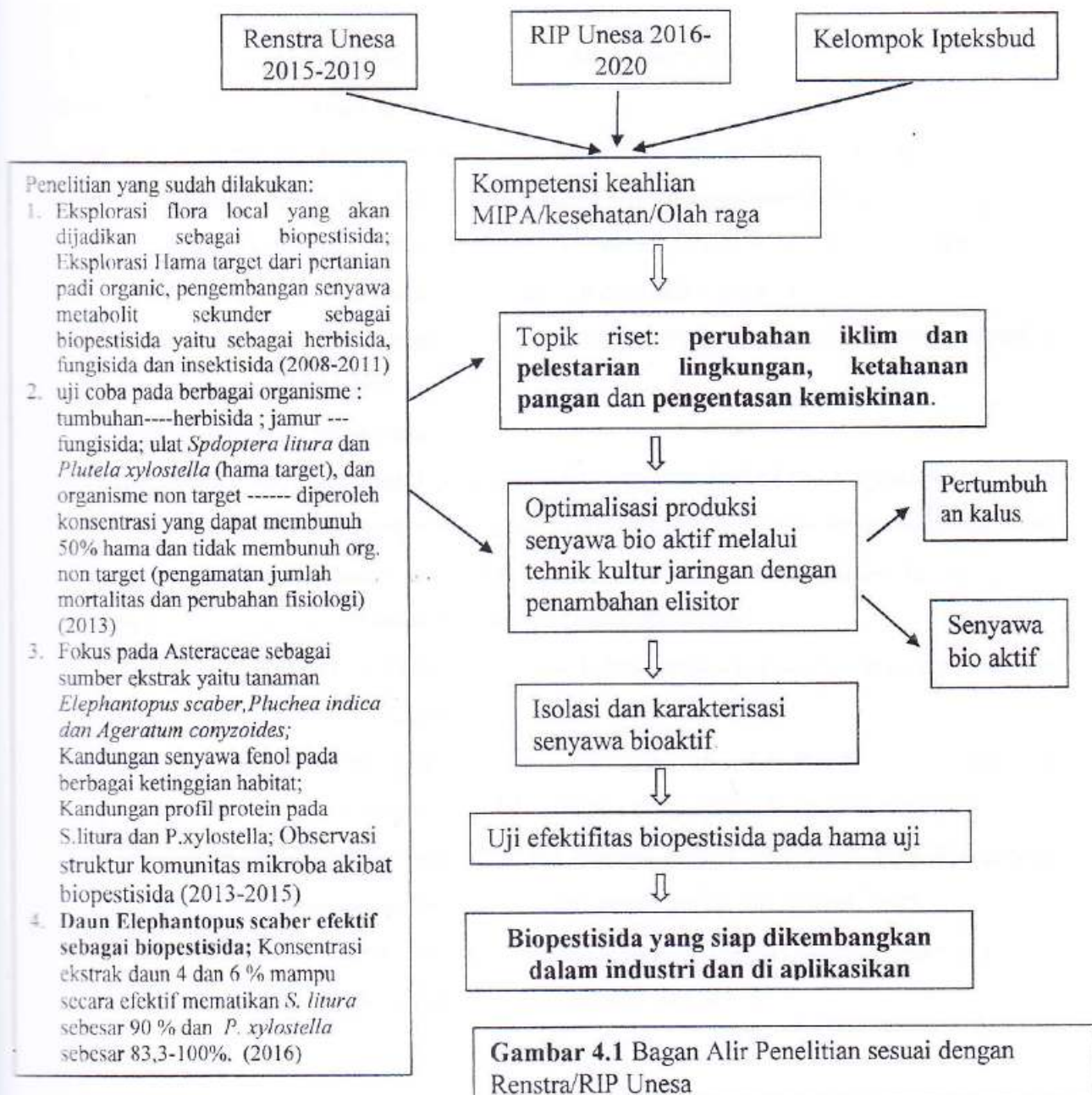
B. Manfaat Penelitian

Manfaat utama penelitian ini adalah menghasilkan metode/teknik kultur jaringan dengan penambahan elisitor, metode isolasi dan karakterisasi dari kalus *E.scaber*, serta produk hasil isolasi senyawa bio aktif dari kalus *E.scaber*, dan biopestisida yang siap di patenkan dan di produksi. Kajian ilmu, metode dan produk yang dihasilkan sangat penting untuk menunjang pengetahuan di bidang Fisiologi tumbuhan, kultur jaringan, kimia organik dan Agroekosistem yang dapat memberi manfaat pada peneliti lain dan masyarakat untuk mengimplementasikannya pada berbagai tujuan.

BAB IV METODE PENELITIAN

A. Jenis penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah 1) eksperimen untuk penelitian tahun pertama, dengan variabel manipulasi jenis dan konsentrasi elisitor, dan variabel respon adalah pertumbuhan kalus dan kandungan senyawa bio aktif, 2) eksplorasi/observasi untuk tahun kedua yaitu tahap isolasi dan eksplorasi senyawa bioaktif, 3) eksperimen untuk tahun ketiga yaitu tahap uji coba pada hama dan penentuan kandungan protein pada hama.



B. Prosedur dan parameter penelitian.

1. Metode Penelitian tahun Pertama

Perbanyakkan senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan dengan menggunakan teknik kultur jaringan dengan penambahan elisitor, dengan cara:

- Mendiskripsikan karakteristik morfologi, anatomi dan fisiologi tanaman *E.scaber* untuk penentuan sumber eksplan yang tepat.
- Penentuan metode teknik kultur jaringan yang tepat
- Penentuan jenis elisitor yang tepat untuk induksi kalus
- Pengambilan data pertumbuhan kalus
- Pengukuran kandungan senyawa bioaktif yang diperoleh

2. Metode Penelitian Tahun kedua

Isolasi dan Karakterisasi Senyawa bio aktif kalus *E.scaber*, langkahnya adalah:

- Ekstraksi dan Isolasi senyawa bioaktif dengan metode Markham (1982)
- Melakukan isolasi dan karakterisasi senyawa metabolit sekunder yang diperoleh
- Karakterisasi senyawa menggunakan Nanodrop Spektrofotometri
- Analisis juga dilakukan dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis, spektrometri IR dan spektrometri ¹H-NMR.

3. Metode Penelitian Tahun ketiga

Tahun ketiga penelitian adalah **Uji bioaktivitas**, senyawa bioaktif yang diperoleh dari kultur jaringan diperlakukan ke hewan uji untuk melihat keefektifan hasil senyawa murni dalam mengendalikan hama dalam skala laboratorium, mengukur total protein hewan uji dan menghasilkan paten sederhana untuk senyawa yang dihasilkan.

- Uji Organisme target terhadap larva instar 2 dari *Spodoptera litura*. Larva diperoleh dari 'BALITAS Karangploso Malang.
- Persiapan senyawa bioaktif dengan dua konsentrasi yang sudah ditentukan (dari penelitian sebelumnya) dengan menggunakan DMSO/dimethylsulphoxide.
- Uji Bioaktivitas, dengan parameter yang diamati adalah **mortalitas ulat**. Pengamatan mortalitas dilakukan dengan interval 24 jam setelah perlakuan sampai 7 hari.
- Tahap berikutnya adalah mengukur **penurunan kandungan protein** pada organisme target yang telah dipapar dengan senyawa bioaktif dan kontrol.

C. Rancangan Penelitian Biopestisida

Digunakan untuk tahun ketiga. Penelitian ini merupakan eksperimen dengan menggunakan rancangan percobaan *post test only design* : $X0 \longrightarrow X1$

Percobaan ini dilakukan untuk menentukan konsentrasi yang tepat dari senyawa bio aktif yang digunakan untuk mortalitas hama target. Pada tahap ini, variable manipulasi adalah konsentrasi, sedangkan variable respon adalah mortalitas dari organisme uji.

D. Analisis Data

Data dari pengamatan morfologi, anatomi dan fisiologi, data pertumbuhan kalus dan senyawa bio aktif akan di analisis secara deskriptif kuantitatif dan kualitatif. Pengukuran kandungan senyawa bio aktif *E.scaber* hasil isolasi dan karakterisasi akan di analisis secara deskriptif kuantitatif. Data untuk uji coba biopestisida pada hewan uji akan dianalisis dengan menggunakan analisis probit untuk menentukan LC 50.

E. Luaran yang diinginkan:

Tahun pertama:

1. Data pertumbuhan kalus
2. Produk senyawa bioaktif dari kalus *E.scaber*
3. Publikasi pada seminar internasional (Prosiding scopus)
4. Publikasi pada jurnal internasional

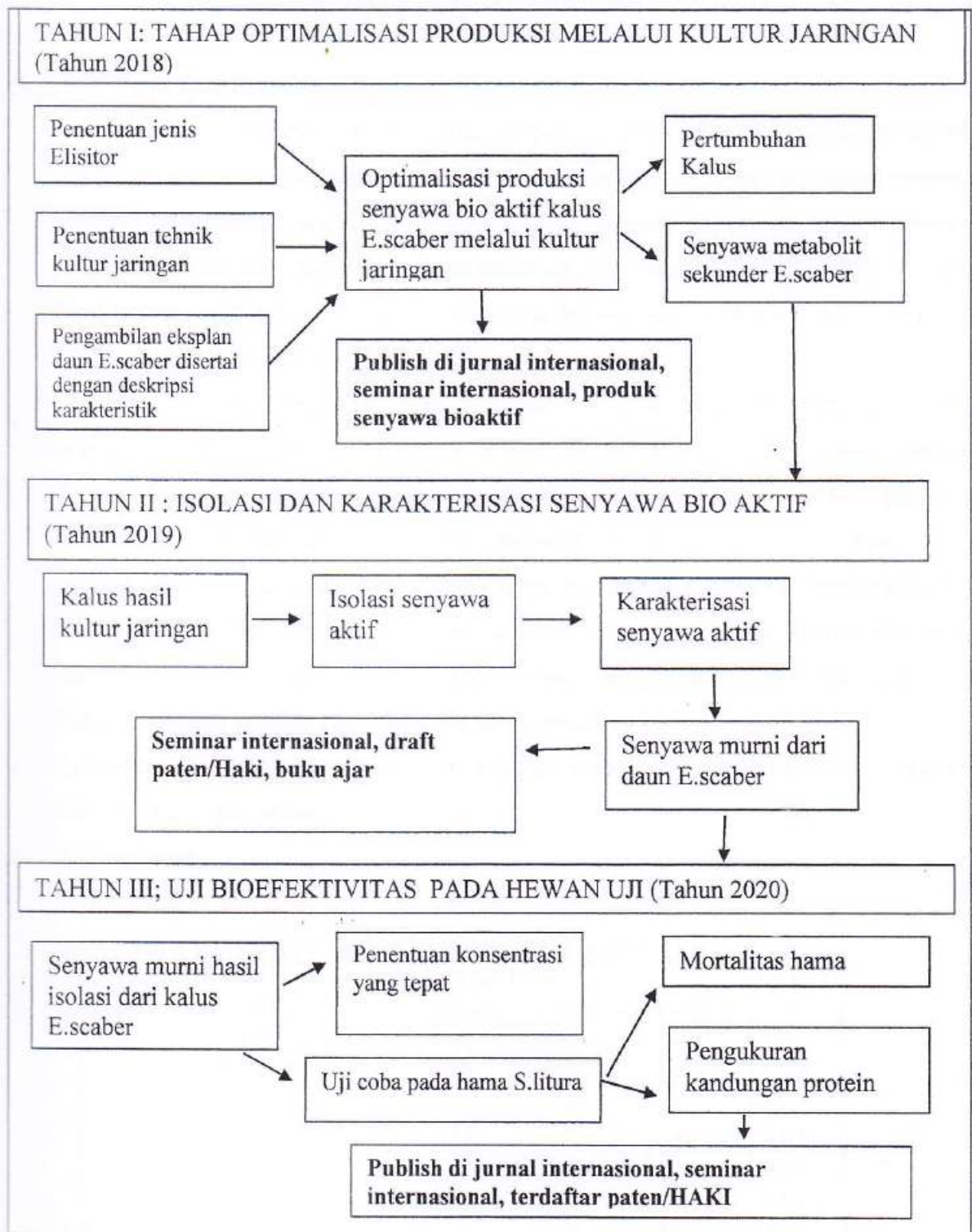
Tahun kedua

1. Produk hasil Isolasi dan karakterisasi dari kalus kultur jaringan *E.scaber*
2. Publikasi dalam seminar internasional - tambahan
3. Buku Ajar ISBN-wajib
4. Draft paten sederhana

Tahun ketiga

1. Data Uji Bioaktivitas
2. Data kandungan total protein pada hewan uji
3. Publikasi dalam seminar nasional/internasional
4. Publikasi pada jurnal internasional-Wajib
5. Paten sederhana-terdaftar -tambahan

F. Tahapan penelitian



Gambar 4.2 Bagan Skematis Prosedur dan Luaran Penelitian

BAB V

HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI

A. Hasil Penelitian Dan Pembahasan

E.Scaber merupakan tanaman yang berpotensi untuk dikembangkan dalam tehnik kultur jaringan untuk di isolasi senyawa metabolit sekundernya, dan digunakan sebagai obat atau biopestisida. Walaupun demikian sebagai sumber eksplan, tanaman *E. scaber* sangat sulit untuk di kultur, karena keberadaan trikoma yang terdapat di batang, pelepah daun, bahkan daun *E.Scaber*. Eksplan yang ditanam seringkali terkontaminasi jamur dan bakteri atau kalau tehnik sterilisasi tidak tepat akan menjadi browning. Karena itu diperlukan deskripsi yang tepat tentang *E.scaber*, baik dari segi pertumbuhannya atau keberadaan trikoma dari berbagai organ untuk bisa membuat *E.scaber* sebagai sumber eksplan. Di awal penelitian adalah mendiskripsikan morfologi (luas daun, tinggi tanaman dan pelepah daun) dari tanaman *E.scaber*, mendiskripsikan anatomi (jenis trikoma yang terdapat pada pelepah daun, tulang daun, daun dan batang *E.scaber*), mendiskripsikan fisiologi dari uji fitokimia metabolit sekunder yang dikandung daun tanaman *E.scaber*, menentukan sumber eksplan yang tepat untuk menghindari kontaminasi sehingga diperoleh sumber eksplan yang tepat dan kalus yang baik.

1). Karakteristik morfologi (tinggi, luas daun dan panjang pelepah daun) serta keberadaan trikome pada organ tanaman

a. Luas daun

Rerata luas daun tanaman *E.scaber* dapat dilihat pada tabel 5.1.

Tabel 5.1. Rerata luas daun pada tanaman *E.scaber*

Tanaman ke	Luas daun (cm ²) pada daun ke					Rerata cm ²
	Daun 1	Daun 2	Daun 3	Daun 4	Daun 5	
1	35	32	18	22	28	27
2	38	15	38	43	43	35,4
3	10	15	13	20	18	15,2
4	38	27	23	31	24	28,6
5	34	46	46	47	40	42,6
6	23	16	10	17	25	18,2
7	33	20	14	18	11	19,2
8	19	13	15	14	10	14,2
9	23	24	27	20	14	21,6
10	33	28	35	19	30	29

11	42	46	27	27	32	34,8
12	26	37	14	17	19	22,6
12	43	31	20	48	46	37,6
14	47	25	33	54	10	33,8
15	15	31	9	41	36	26,4
16	18	24	24	41	11	23,6
17	16	44	30	40	40	34
18	18	11	23	23	31	21,2
19	11	11	14	29	14	15,8
20	12	19	16	11	16	14,8
Rerata luas daun pada semua tanaman						25,78

Hasil rata-rata luas daun menunjukkan bahwa pada tanaman *E. scaber* sebesar 25,78 cm², dengan rentang luas daun 14,8- 42,6 cm². Dari 20 tanaman yang diamati, tanaman dengan rata-rata luas daun terlebar (42,6 cm²) terdapat pada tanaman nomor 5, sedangkan tanaman dengan rata-rata terkecil (14,8 cm²) terdapat pada tanaman 8. Berdasarkan hasil rata-rata luas daun yang diperoleh, dapat diketahui bahwa tiap tanaman *E. scaber* memiliki luas daun yang berbeda, semakin lama umur tanaman *E. scaber* maka semakin lebar luas daunnya.

b. Panjang pelepah daun

Data morfometri dari panjang pelepah daun juga diukur mulai dari pangkal daun hingga batas tulang daun. Adapun hasil pengamatan rata-rata panjang pelepah, diperoleh hasil yang berbeda-beda dari tiap perlakuan (Tabel 5.2). Masing-masing perlakuan yaitu satu tanaman *E. scaber* diambil 5 daun sebagai pengulangan. Dari 20 tanaman yang diamati, tanaman dengan rata-rata panjang pelepah tertinggi sebesar 2,7 cm. Sedangkan tanaman dengan rata-rata terkecil sebesar 1,2 cm. Berdasarkan hasil rata-rata panjang pelepah yang diperoleh, dapat diketahui bahwa tiap tanaman *E. scaber* memiliki panjang pelepah yang berbeda, Rerata pelepah daun pada semua tanaman adalah 1,86 cm seperti pada tabel 5.2.

Tabel 5.2. Rerata panjang pelepah daun tanaman *E. scaber*

Tanaman ke	Panjang pelepah daun (cm) pada daun ke					Rerata
	Daun 1	Daun 2	Daun 3	Daun 4	Daun 5	
1	2	2,5	2	1	2,5	2
2	2	2,5	2,5	2,5	2	2,3
3	2	2	1,5	1,5	1,5	1,7
4	1,5	1,5	1	2	2	1,6
5	1,5	2	2	2	2,5	2
6	3	2	2	2	2	2,2
7	1	2	2	2	2,5	1,9

8	2	2	2	2	2	2
9	1,5	1,5	1,5	1	1	1,3
10	2	2	1,5	1,5	2	1,8
11	2	1,5	1,5	2	1,5	1,7
12	2	1,5	2	1,5	1,5	1,7
12	1	2	2	2	1,5	1,7
14	1,5	2	2	2	2	1,9
15	2	2	2	2	2	2
16	3	3	2,5	2,5	2,5	2,7
17	1	1	1,5	1,5	1	1,2
18	2	2	2,5	2,5	2,5	2,3
19	2	2	2	2	2	2
20	1,5	1,5	1	1	1,5	1,3
Rerata panjang pelepah daun pada semua tanaman						1,86

c. Tinggi tanaman

Tinggi tanaman diperoleh pada 20 tanaman yang berbeda, hasilnya sebagai berikut :

Tabel 5.3. Rerata tinggi tanaman

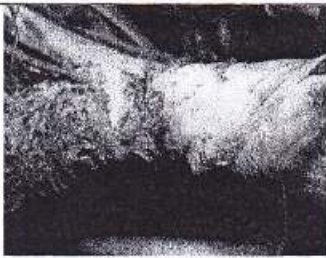
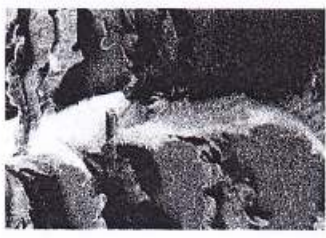
Tanaman ke	Tinggi tanaman (cm)
1	3.5
2	3.3
3	3.4
4	3.8
5	3.3
6	3,3
7	4.5
8	6
9	5.5
10	4
11	4,5
12	4
13	5
14	5
15	3
16	4
17	3,75
18	4
19	2
20	5
Rerata tinggi tanaman	3,66

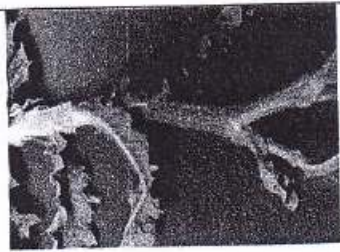
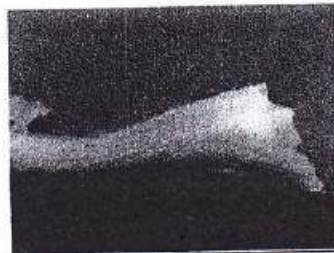
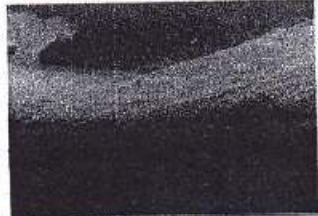
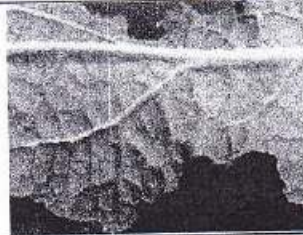
Dari 10 tanaman yang diukur, tinggi tanaman tertinggi sebesar 6 cm, sedangkan tanaman terendah sebesar 2 cm. Tinggi tanaman memiliki ukuran yang tidak jauh berbeda berkisar 2 – 6 cm. Perbedaan tinggi tanaman dipengaruhi oleh faktor umur tanaman. Semakin lama umur tanaman maka semakin tinggi ukuran tanaman tersebut.

d. Pengamatan morfologi trikoma pada organ tanaman

Berdasarkan hasil pengamatan morfologi tanaman *E. scaber*, dapat diketahui bahwa trikoma berada pada bagian batang dan semua bagian dari daun *E. scaber* yaitu pelepah daun, tulang daun, helai daun bagian abaksial maupun adaksial. Sedangkan pada bagian akar tidak ditemukan trikoma. Adapun kerapatan antar trikoma dapat dilihat di gambar pada Tabel 5.4.

Tabel 5.4. Pengamatan morfologi trikoma pada tanaman *Elephantopus scaber*

No.	Bagian Tanaman	Persebaran Trikoma	Jenis Trikoma	Gambar
1	Akar	Tidak ada	-	
2	Pangkal batang	Trikoma terdapat di tiap buku batang. Posisi tegak mengelilingi nodus batang	Non Glandular	
3	Internodus batang	Trikoma memenuhi permukaan internodus batang	Non Glandular	
4	Ujung batang	Trikoma memenuhi permukaan ujung batang	Non Glandular	

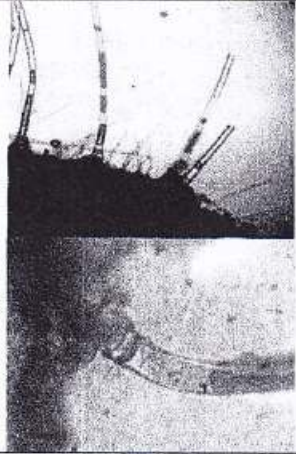
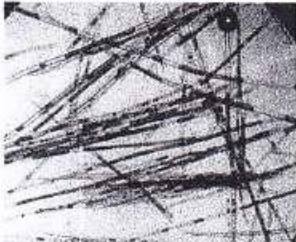
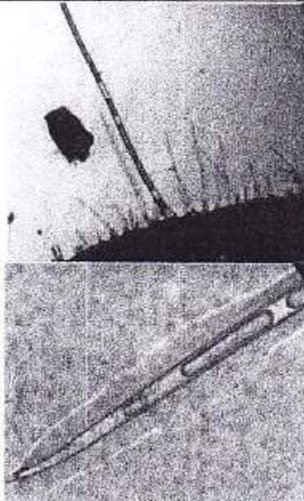
No.	Bagian Tanaman	Persebaran Trikoma	Jenis Trikoma	Gambar
				
5	Pelepah daun	Trikoma tumbuh lebat pada pelepah daun	Non Glandular	
6	Tulang daun	Trikoma memenuhi permukaan tulang daun	Non Glandular	
7	Helai daun sisi adaksial	Trikoma yang memiliki ukuran bervariasi tersebar pada permukaan atas daun	Non Glandular	
8	Helai daun sisi abaksial	Trikoma tersebar pada permukaan bawah daun	Non Glandular	

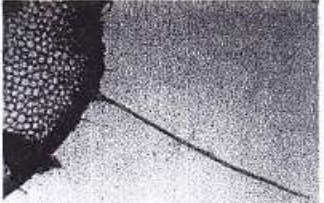
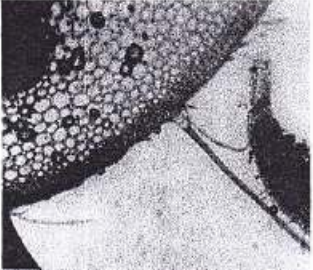
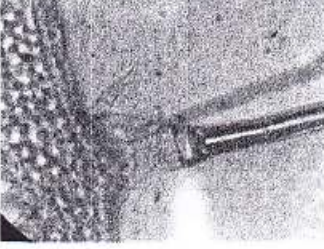
Trikoma ditemukan pada ujung batang, nodus batang, pangkal batang, pelepah daun, tulang daun, helai daun sisi abaksial dan adaksial. Jenis trikoma adalah non glandular yang ditandai dengan terdapatnya rambut kasar yang tidak menghasilkan secret. Trikoma terdapat dalam bentuk duri- duri halus sehingga menyebabkan daun bertekstur kasar dan tidak disukai herbivore.

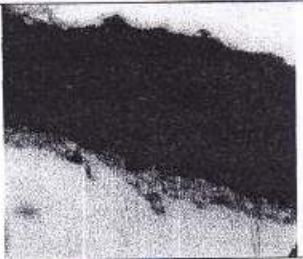
2) Karakteristik anatomi trikoma pada organ batang dan daun.

Adapun hasil pengamatan anatomi menunjukkan bahwa trikoma yang menyelimuti permukaan tanaman *E. scaber* memiliki susunan sel uniseluler dan berjenis non glandular, serta penampang trikoma berwujud rambut biasa sebab sel-selnya tidak mengandung cairan khusus yang disekresikan, direkresikan ataupun diekskresikan. Trikoma dapat diamati pada Tabel 5.5.

Tabel 5.5. Penampang anatomi trikoma pada tanaman *Elephantopus scaber*

No	Bagian Tanaman	Jenis Trikoma	Bentuk Trikoma	Gambar
1	Batang	Non Glandular	Rambut sederhana menyerupai jarum	
2	Sisik pada buku batang	Non Glandular	Rambut sederhana menyerupai jarum	
3	Pelepah daun	Non Glandular	Rambut sederhana menyerupai jarum	

No	Bagian Tanaman	Jenis Trikoma	Bentuk Trikoma	Gambar
4	Tulang daun sisi pangkal	Non Glandular	Rambut sederhana menyerupai jarum	 
5	Tulang daun sisi tengah	Non Glandular	Rambut sederhana menyerupai jarum	 
6	Tulang daun sisi pucuk	Non Glandular	Rambut sederhana menyerupai jarum	 
7	Helai daun	Non Glandular	Rambut sederhana menyerupai jarum	

No	Bagian Tanaman	Jenis Trikoma	Bentuk Trikoma	Gambar
				

Hasil dari pengamatan anatomi, keseluruhan trikoma yang diperoleh merupakan jenis trikoma non glandular. Trikoma merupakan perkembangan dari epidermis, sel sel epidermis membentuk struktur berupa rambut rambut yang menonjol ke arah luar (Fahn, 1982). Dalam penelitian ini trikoma berbentuk rambut yang seperti jarum. Trikoma memiliki fungsi dalam mengurangi intensitas cahaya matahari dan melindungi tumbuhan dari pemangsa.

3). Karakteristik Fisiologi dari daun tanaman *E.scaber*

Karakteristik Fisiologi dari tanaman *E.scaber* diperoleh dari uji fitokimia (metabolit sekunder) ekstrak methanol daun tapak liman.

Tabel 5.6. Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Metanol Tumbuhan *E.scaber*

No.	Identifikasi	Hasil uji	Kesimpulan
1.	Alkaloid		Negatif
	- Dragendorff	Larutan hijau keruh, tidak terbentuk endapan putih	
	- Wagner	Larutan coklat, terbentuk endapan coklat	
	- Mayer	Larutan hijau kecoklatan, tidak terbentuk endapan jingga	
2.	Flavonoid	Larutan berwarna coklat kemerahan	Positif
3.	Saponin	Terbentuk busa yang stabil	Positif
4.	Steroid	Larutan berwarna coklat	Negatif
5.	Triterpenoid	Terbentuk dua lapisan, lapisan atas berwarna kecoklatan	Positif
6.	Tanin	Larutan berwarna hijau tua, tidak terbentuk endapan	Negatif
7.	Fenolik	Larutan berwarna coklat kehitaman	Positif

Hasil Uji kimia menunjukkan bahwa daun *E.scaber* mengandung senyawa metabolit sekunder flavonoid, saponin, triterpenoid, fenolik dan tidak mengandung alkaloid, steroid dan tannin. Dari keempat senyawa metabolit sekunder tersebut menunjukkan bahwa *E.scaber* memiliki potensi sebagai biopestisida ataupun tanaman obat.

4). Penentuan sumber eksplan yang tepat dari tanaman *Elephantopus scaber*.

Berdasarkan keberadaan trikoma pada *E scaber*, maka sulit untuk menjadikan *E.scaber* sebagai sumber eksplan padahal kandungan metabolit sekundernya cukup besar. Hambatan penelitian dimulai dari mengkultur daun *E. scaber* sebagai sumber eksplan. Hasil penelitian menunjukkan hambatan sebagai berikut:

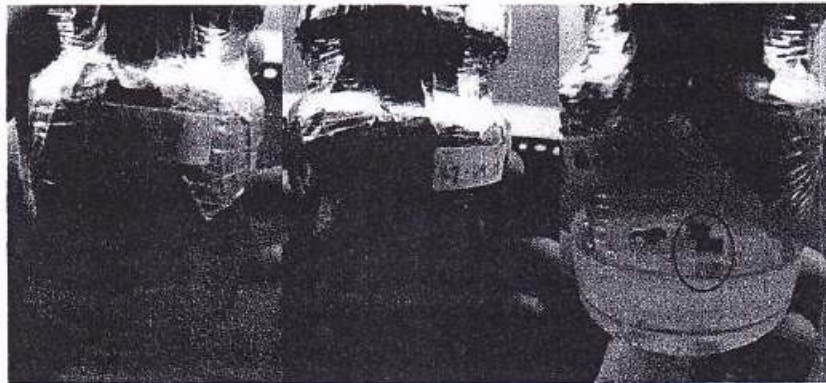
Penelitian kultur terhadap daun tapak liman yang telah dilakukan selama 4 periode diperoleh hasil seperti pada Tabel 5.7. Pada periode pertama pada tanggal 12 April 2018 dilakukan inokulasi eksplan sebanyak 60 eksplan pada 20 botol kultur dimana masing-masing botol berisi 3 eksplan. Periode kedua pada tanggal 19 April 2018 terdapat 90 eksplan dan periode ketiga pada tanggal 27 April 2018 terdapat 90 eksplan. Pada ketiga periode belum terdapat eksplan yang tumbuh karena didominasi gangguan pertumbuhan berupa kontaminan jamur dan bakteri. Pada periode keempat Mei 2018 diperoleh hasil tumbuh eksplan sebanyak 51 eksplan dari 60 eksplan yang ditanam. Adapun pada periode keempat juga terdapat kontaminasi jamur dan bakteri, walaupun pada awalnya 51 hidup tetapi setelah 2 minggu setelah tanam, seluruh eksplan mati terkena mikroba.

Tabel 5.7. Jumlah kultur eksplan daun tanaman tapak liman dengan perlakuan penambahan ZPT 2,4D dan BAP

Periode	Jumlah eksplan				
	Total	Hidup	Browning	Kontaminasi	
				Bakteri	Jamur
12 April 2018	60	0	6	3	51
19 April 2018	90	0	9	10	71
27 April 2018	90	0	12	8	70
28 Mei 2018	60	0	10	10	40

Pada periode pertama hingga periode keempat, eksplan yang ditanam tidak mengalami pertumbuhan dikarenakan dominan mengalami kontaminasi jamur yang ditandai dengan

tumbuhnya hifa yang terdapat di permukaan media maupun permukaan eksplan potongan tulang daun tapak liman. Berbeda dengan kontaminasi bakteri yang ditandai dengan munculnya lendir pada area sekeliling eksplan berwarna putih keruh. Adapun beberapa mengalami *browning* hingga *blackening* akibat potongan eksplan yang terlalu kecil maupun terlalu lama dalam perendaman larutan *chlorox*.



(a) (b) (c)

Gambar 5.1. (a) eksplan yang tumbuh baik berwarna hijau, (b) eksplan yang terkontaminasi jamur, (c) eksplan yang terkontaminasi bakteri (Dokumentasi Pribadi)

Inokulasi daun tapak liman yang memiliki ciri morfologi yang mana terdapat banyak trikom yang menyelubungi sehingga sangat rentan menjadi tempat berkembang biak kontaminan baik bakteri maupun jamur. Pada penelitian ini, kedua perlakuan terhadap eksplan tersebut juga direndam sambil dikocok dengan *chlorox* 5% selama 10 menit kemudian dengan *chlorox* 10% selama 5 menit. Fungsi pengocokan eksplan dengan *chlorox* atau *sodium hypochloride* adalah sebagai sterilisasi permukaan eksplan sehingga dapat mencegah terjadinya berbagai kontaminasi. Di lain sisi, *chlorox* juga menjadi *phytotoxic* yang dapat membuat eksplan mengalami *browning* akibat sel-selnya yang mati (Manzanilla, 2010).

Karena dengan sumber eksplan daun, banyak kultur yang mati kemudian dicoba menggunakan sumber eksplan yang lain yaitu pelepah daun, dan hasilnya sebagai berikut: penelitian kultur jaringan dilakukan dengan penambahan ZPT 2,4-D 0,04 mg/L dan kinetin 0,02 mg/L yang dilakukan terhadap daun tanaman tapak liman yang meliputi eksplan bagian lamina dan pelepah daun, diperoleh hasil pengamatan yang ditunjukkan pada Tabel 5.8.

Tabel 5.8. Jumlah kultur eksplan daun tanaman tapak liman dengan perlakuan penambahan ZPT pada 2 MST

Waktu Inkubasi	Eksplan Lamina					Eksplan Petiolus				
	Total	Hidup	<i>Browning</i>	Kontaminasi		Total	Hidup	<i>Browning</i>	Kontaminasi	
				B	J				B	J
0 MST	180	180	-	-	-	180	180	-	-	-
1 MST	180	45	27	30	78	180	132	15	21	12
2 MST	180	6	21	39	114	180	57	21	36	66

Ket:

B : Kontaminan bakteri

J : Kontaminan jamur

MST : Minggu Setelah Tanam

Hasil kultur yang diperoleh diketahui bahwa eksplan bagian pelepah daun memiliki persentase hidup lebih tinggi dibandingkan dengan eksplan lamina. Hal tersebut dijelaskan pada Tabel 5.8 yang menunjukkan bahwa dari 180 potongan eksplan lamina hanya terdapat 6 potongan eksplan hidup pada 2 MST. Berbeda dengan pelepah daun dengan jumlah yang sama memiliki 57 potongan eksplan hidup pada pengamatan 2 MST (walaupun demikian setelah di sub kultur pada 2 MST, eksplan mati).

Perbedaan pertumbuhan eksplan pada bagian lamina dan pelepah daun dipengaruhi oleh perlakuan pengurangan trikoma pada permukaan eksplan. Pengurangan eksplan pada lamina mengalami kesukaran dikarenakan pembersihan trikoma lebih keras menyebabkan sel-sel lamina lisis dengan menghitamkan lapisan lamina. Berbeda dengan pembersihan trikoma pada permukaan pelepah daun yang dengan mudah menyayat trikoma tanpa membuat sel lisis dikarenakan permukaan pelepah daun lebih licin dibandingkan lamina. Oleh karena itu, pada bagian lamina masih meninggalkan banyak trikoma dibandingkan dengan bagian pelepah daun walaupun setelah dilakukan pembersihan trikoma. Ciri morfologi tanaman tapak liman banyak trikoma yang menyelubungi (tabel 5.4) membuat eksplan sangat rentan terhadap kontaminan karena trikoma menjadi tempat berkembang biak kontaminan baik bakteri maupun jamur.

Kemampuan hidup eksplan tapak liman didukung oleh keberadaan kontaminan yang terdapat di sekitar eksplan. Eksplan yang ditanam tidak mengalami pertumbuhan dikarenakan dominan mengalami kontaminasi jamur yang ditandai dengan tumbuhnya hifa yang terdapat di

permukaan media maupun permukaan eksplan potongan tulang daun tapak liman (Gambar 5.1b). Berbeda dengan kontaminasi bakteri yang ditandai dengan munculnya lendir pada area sekeliling eksplan berwarna putih keruh (Gambar 5.1c). Adapun beberapa mengalami *browning* hingga *blackening* akibat potongan eksplan yang terlalu kecil maupun terlalu lama dalam perendaman larutan *chlorox*.

Pada penelitian ini, perlakuan terhadap kedua jenis eksplan tersebut direndam sambil dikocok dengan *chlorox* 5% selama 10 menit kemudian dengan *chlorox* 10% selama 5 menit. Fungsi pengocokan eksplan dengan *chlorox* atau *sodium hypochloride* adalah sebagai sterilisasi permukaan eksplan sehingga dapat mencegah terjadinya berbagai kontaminasi. Di lain sisi, *chlorox* juga menjadi *phytotoxic* yang dapat membuat eksplan mengalami *browning* akibat sel-selnya yang mati (Manzanilla, 2010).

Sterilisasi pada penelitian kultur jaringan terdiri atas sterilisasi alat, sterilisasi media, sterilisasi praktikan, sterilisasi eksplan dan sterilisasi tempat kultur. Sterilisasi memegang peranan penting dalam menjaga kondisi kultur untuk terbebas dari kontaminasi penyakit baik itu dari bakteri, jamur maupun virus. Shofiyani dan Hajoeningtjas (2010) mengungkapkan sterilisasi adalah tahap awal kegiatan kultur kalus yang memiliki peran penting atas keberhasilan penyediaan eksplan yang bebas dari kontaminasi. Metode sterilisasi yang digunakan dengan ketepatan cara, bahan sterilan maupun waktu sterilisasi yang digunakan akan menentukan keberhasilan proses sterilisasi yang dilakukan.

Pencarian berbagai sumber eksplan yang tepat untuk kultur jaringan supaya dihasilkan kalus yang baik diperlebar dengan menggunakan tulang daun, karena pada tahap penelitian ketiga, seluruh eksplan juga mati karena *browning* dan mikroba. Sumber eksplan yang digunakan adalah eksplan daun, pelepah daun dan tulang daun. Eksplan sebelum digunakan diberi perlakuan untuk menghilangkan trikomyanya. Berdasarkan penelitian kultur jaringan dengan penambahan ZPT 2,4-D 0,04 mg/L dan kinetin 0,02 mg/L diperoleh hasil pengamatan yang ditunjukkan pada Tabel 5.9.

Tabel 5.9. Jumlah kultur eksplan pelepah daun, tulang daun dan lamina daun tanaman tapak liman dengan perlakuan penambahan ZPT pada 2 minggu setelah tanam (MST).

Waktu Inkubasi	Eksplan pelepah daun				
	Total	Hidup	<i>Browning</i>	Kontaminasi	
				B	J
0 MST	40	40	-	-	-
1 MST	40	18	10	12	-
2 MST	40	-	14	23	-
Eksplan tulang daun					
0 MST	40	40	-	-	-
1 MST	40	21	-	15	4
2 MST	40	11	-	23	6
Eksplan lamina daun					
0 MST	40	40	-	-	-
1 MST	40	10	6	7	17
2 MST	40	1	5	9	25

Keterangan:

B : Kontaminan bakteri

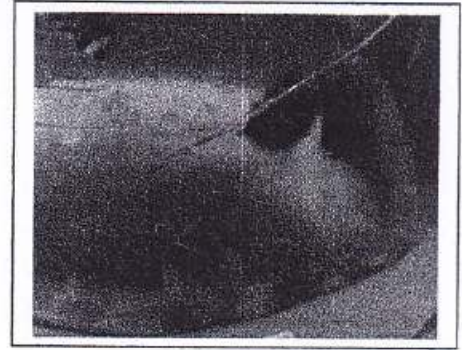
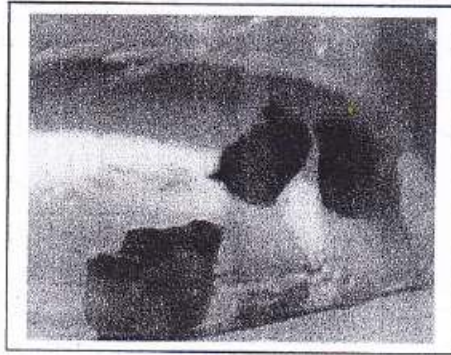
J : Kontaminan jamur

MST : Minggu Setelah Tanam

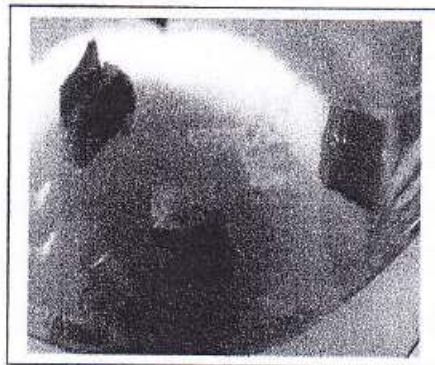
Hasil kultur yang diperoleh menunjukkan bahwa eksplan bagian tulang daun memiliki persentase hidup lebih tinggi dibandingkan dengan eksplan pelepah dan lamina daun. Hal tersebut dijelaskan pada Tabel 5.9 yang menunjukkan bahwa dari 20 potongan eksplan pelepah tidak terdapat eksplan hidup pada pengamatan 2 MST, tetapi masih terdapat 11 eksplan hidup pada 2 MST dari sumber eksplan tulang daun dan 1 eksplan hidup dari lamina daun. Berbeda dengan tulang daun dengan jumlah 40 potong eksplan memiliki 11 potongan eksplan hidup pada pengamatan 2 MST. Eksplan setelah dua minggu di sub kultur. Pada 4 MST potongan eksplan yang hidup sejumlah 4 untuk kemudian di sub kultur sampai menjadi kalus. Pembuatan kalus diulang dalam beberapa kali media tanam sampai 8 minggu sesudah tanam.

6. Hasil kalus dari kultur jaringan tanaman *E.scaber*

Hasil penelitian diperoleh kalus yang mulai muncul setelah 1,5 bulan penanaman, seperti pada gambar 5.2 berikut:



Gambar 5.2. Pertumbuhan kalus dalam 1,5 bulan



Gambar 5.3. Pertumbuhan kalus dalam 2 bulan

7. Pertumbuhan Kalus

Pertumbuhan kalus tanaman tapak liman setelah dua bulan (60 hari) kemudian ditimbang untuk selanjutnya diperlakukan dengan elisitor, adapun pertumbuhan kalus (biomassa basah) adalah sebagai berikut:

Tabel 5.10 Rerata Biomassa Basah kalus (g) setelah 8 Minggu Setelah tanam

No.	Biomassa basah (g)		Warna Kalus	Konsistensi kalus
	Ulangan 1	Ulangan 2		
1	0.55	0.70	Hijau	Remah
2	0.61	0.45	Hijau	Remah
3	0.10	0.46	Hijau	Remah
4	0.82	0.76	Hijau	Remah
5	0.61	0.89	Hijau	Remah
6	0.87	0.71	Hijau	Remah
7	0.28	0.14	Hijau	Remah
8	0.22	0.31	Hijau	Remah
Rerata	0,508	0,553		

Dari kalus yang diperoleh, maka kemudian diperlakukan dengan elisitor, untuk ulangan 1 diperlakukan dengan Pb asetat, dan ulangan ke dua menggunakan Al sulfat. Hasil perlakuan dengan logam berat menunjukkan bahwa dengan perlakuan Al, kalus menjadi browning sedangkan dengan perlakuan Pb kalus masih tetap hijau.

8. Senyawa Fenol Ekstrak Daun *E.scaber*

Berdasarkan hasil uji fitokimia maka dilakukan analisis kadar senyawa fenol dan flavonoid dengan menggunakan spektrofotometer UV Vis dan hasilnya sebagai berikut:

Tabel 5.11. Kadar senyawa fenol dan flavonoid ekstrak methanol daun tanaman Tapak Liman

Ulangan	Kadar senyawa fenol (mg/mL) Tanaman Tapak liman	
	Fenol	Flavonoid
1	0,214	0.009
2	0,200	0.010
3	0,211	0,011
Rerata	0,208	0,010

Tanaman *E scaber* mempunyai kadar fenol sebesar 0,208 mg/ml dan flavonoid sebesar 0,010 mg/ml.

Pada penelitian ini diperoleh hambatan dalam hal penyediaan eksplan yang tepat sebagai sumber eksplan kultur jaringan. Sebagai catatan pada bulan April 2018 sudah mencoba 240 kultur kalus eksplan daun, bulan Mei 60 dan bulan Juli 40 kultur kalus

eksplan lamina daun, tulang daun dan pelepah daun. Pada bulan Agustus menanam 45 kultur eksplan lamina, 150 eksplan tulang daun, dan Bulan Oktober menanam kembali 153 kultur kalus eksplan daun (untuk persiapan pengambilan senyawa metabolit sekunder). Dari penanaman bulan Agustus ada sekitar 16 kalus yang diperoleh, yang kemudian diperlakukan dengan elisitor. Dari penelitian tersebut kemudian diperoleh metode steril yang tepat untuk berbagai macam sumber eksplan yang digunakan.

Pembahasan

Metabolit sekunder disintesis oleh tanaman, sebagian besar berfungsi sebagai fitoaleksin, yakni sebagai antibodi untuk mempertahankan diri ketika tanaman tersebut mengalami gangguan eksternal seperti adanya serangan pathogen, pencemaran, logam berat, perubahan suhu lingkungan atau radiasi ultraviolet (Dixon dan Paiva, 1995). Daun Tanaman *E.scaber* mengandung senyawa metabolit sekunder flavonoid, saponin, triterpenoid, fenolik (tabel 6), yang dapat berfungsi sebagai obat, biopestisida dan antibakteri. Walaupun demikian tingkat produksi metabolit sekunder dalam jaringan tumbuhan relatif rendah (kurang dari 1% berat kering tumbuhan) dan sangat tergantung pada kondisi fisiologis dan tahapan perkembangan tumbuhan (Yu *et al.*, 2003; Taiz dan Zeiger, 2010). Salah satu strategi untuk meningkatkan kandungan senyawa metabolit sekunder adalah melalui teknik kultur jaringan tumbuhan, yang mempunyai beberapa keuntungan dibandingkan dengan metode konvensional, salah satunya dapat membentuk senyawa bioaktif dalam kondisi terkontrol dan dalam waktu yang relatif singkat. Untuk memproduksi metabolit sekunder biasa digunakan kultur suspensi dan kultur kalus (Mulabagal, 2004).

Pembentukan kalus dipengaruhi oleh suplai hormon eksogen. Diantara hormon yang mempengaruhi pembentukan kalus adalah auksin dan sitokinin. Faktor lain yang mempengaruhi pembentukan kalus adalah genotip, kondisi fisiologis eksplan, komposisi nutrisi pada medium pertumbuhan, dan kandungan hormon (auksin dan sitokinin) endogen (Chawla, 2002).

Kondisi fisiologis eksplan sangat mempengaruhi terbentuknya kalus. Hasil penelitian terkait morfologi menunjukkan bahwa pertumbuhan tanaman *Elephantopus scaber* sangat baik dari segi luas daun, panjang pelepah ataupun tinggi tanaman. Rerata luas daun sebesar 25,78 cm², panjang pelepah daun 1,86 cm dan tinggi tanaman sebesar 3,66 cm (tabel 1,2,3). Pertumbuhan tanaman dipengaruhi oleh faktor internal (hormon dan gen), juga oleh factor

eksternal yaitu lingkungan seperti cahaya, suhu, kelembaban, tanah, dan ketinggian tempat. Faktor ketinggian mempengaruhi klimaterik (iklim) dan edafik (tanah) pada habitat pertumbuhan tanaman, (Yuliani, *et al.* 2015). Pertumbuhan yang baik mengindikasikan kalau pertumbuhan sel dan jaringan meristem yang dibutuhkan untuk proses totipotensi juga berlangsung dengan baik. Sumber eksplan juga harus bebas dari hama dan penyakit, sehingga harus steril. Tanaman *E.scaber* secara morfologi dan anatomi mempunyai trikoma yang sangat lebat. Trikoma non glandular berupa rambut rambut yang menonjol ke arah luar dan berbentuk jarum. Trikoma mempunyai fungsi pertahanan bagi tumbuhan dan juga habitat bagi mikroba, sehingga apabila digunakan sebagai sumber eksplan, daun yang banyak trikomanya sangat rentan menjadi tempat berkembang biak kontaminan (baik bakteri maupun jamur). Karena itu dalam sumber eksplan, trikoma harus dihilangkan dan eksplan harus disterilisasi.

Sterilisasi pada penelitian kultur jaringan terdiri atas sterilisasi alat, sterilisasi media, sterilisasi praktikan, sterilisasi eksplan dan sterilisasi tempat kultur. Sterilisasi memegang peranan penting dalam menjaga kondisi kultur untuk terbebas dari kontaminasi penyakit baik itu dari bakteri, jamur maupun virus. Shofiyani dan Hajoeningtjas (2010) mengungkapkan sterilisasi adalah tahap awal kegiatan kultur kalus yang memiliki peran penting atas keberhasilan penyediaan eksplan yang bebas dari kontaminasi. Metode sterilisasi yang digunakan dengan ketepatan cara, bahan steril maupun waktu sterilisasi yang digunakan akan menentukan keberhasilan proses sterilisasi yang dilakukan (Manzanilla, 2010).

Kesulitan dalam penelitian ini karena eksplan daun tapak liman memiliki ciri morfologi yang terdapat banyak trikoma yang menyelubungi sehingga sangat rentan menjadi tempat berkembang biak kontaminan baik bakteri maupun jamur. Karena itu dalam penelitian ini kemudian di cari sumber eksplan yang tepat dan metode sterilisasi yang tepat bagi setiap sumber eksplan.

Berdasarkan hasil penelitian awal dari kultur jaringan, maka diperoleh sumber eksplan terbaik terdapat pada tulang daun. Dibagian tulang daun, trikhoma tidak setebal di lamina daun, selain itu di tulang daun juga terdapat pembuluh angkut sehingga proses difusi osmosis hara di dalam media tanam juga berlangsung dengan baik. Keberadaan hara bagi eksplan selain untuk pertumbuhan menjadi kalus, juga dapat digunakan untuk meningkatkan ketahanan eksplan terhadap mikroba.

Elisitasi merupakan salah satu cara efektif untuk meningkatkan produksi senyawa metabolit sekunder. Zat yang mempengaruhi diproduksinya fitoaleksin disebut elisitor (Namdeo, 2007). Elisitor menstimulasi pembentukan metabolit sekunder untuk melindungi sel dan seluruh bagian tumbuhan (Estrada *et al.* 2016). Dalam penelitian ini digunakan Pb asetat dan Al sulfat. Logam berat dalam bentuk garam digunakan sebagai elisitor abiotik karena cukup tersedia, mudah digunakan, dan murah. Namun, pemilihan jenis garam dan konsentrasi yang digunakan harus tepat karena efek toksisitas logam yang berlebihan justru akan menurunkan kandungan metabolitnya (Angelova *et al.*, 2006 ;Sukmaningrum, 2005). Perlakuan elisitor ion logam Al^{3+} pada kultur kalus akar *Gloriosa superba* meningkatkan kolkisin intraseluler pada akar 63 kali lipat (Young dkk, 2006). Sedangkan pemberian Pb^{2+} 5 mg/l meningkatkan saponin pada kultur *Glycyrrhiza glabra* 250% dibandingkan kontrol (Tumova *et al.*, 2007). Mekanisme elisitasi terjadi karena ada pengikatan elisitor pada reseptor membran plasma, yang dikenali oleh sel sebagai senyawa kimia, yang akan menginduksi respon fisiologis dan morfologis serta akumulasi fitoaleksin sebagai mekanisme pertahanan tumbuhan. (Radman, 2003).

B. Luaran yang Dicapai

Luaran yang dicapai pada penelitian PDUPT ini adalah :

1. Produk penelitian- kalus hasil kultur jaringan
2. Artikel di jurnal international scopus –submit Journal of Agricultural Science and Technology
3. Artikel terdapat dalam proseding terindex scopus, Penerbit : AP
4. Seminar International ICST di Nusa Dua Bali
5. Buku E.scaber -Draft

BAB VI

RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA

Rencana pada Tahun kedua dari penelitian ini adalah: Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Bio aktif dari *E.scaber*. Langkah langkahnya adalah :a) Mengisolasi senyawa bio aktif yang terdapat dalam kalus *E. scaber* hasil kultur jaringan,b) Mengidentifikasi karakteristik senyawa fenol yang terdapat di dalamnya,

Dengan demikian, proses kultur jaringan dengan penambahan elisitor untuk memperoleh kalus tetap dilakukan, setelah itu dilakukan karakteristik terhadap senyawa metabolit sekunder yang diperoleh. Pada tahun kedua penelitian ini, peneliti akan bekerja sama dengan laboratorium kimia organik dan lab Terpadu FMIPA Unesa, untuk karakterisasi dan analysis senyawa metabolit sekunder. Luaran yang diinginkan adalah Produk metabolit sekunder dari *E scaber*, Seminar internasional, Proseding International terindex dan Buku Ajar ber ISBN.

BAB VII

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan analisis data maka dapat disimpulkan bahwa :

1. Tanaman *Elephantopus scaber* yang hidup pada dataran sedang mempunyai karakter morfologi yaitu rerata luas daun = $25,78 \text{ cm}^2$, panjang pelepah daun = 1,86 cm dan tinggi tanaman sebesar 3,66 cm. Tanaman *Elephantopus scaber* mempunyai ciri trikoma non glandular yang berbentuk jarum, dan memiliki karakter fisiologi mengandung senyawa metabolit sekunder yaitu senyawa flavonoid, saponin, fenol dan triterpenoid.
2. Pertumbuhan kalus menunjukkan bahwa rerata biomassa kalus sebesar 0,5305 g, berwarna hijau dan remah.
3. Daun *E. scaber* mempunyai kadar senyawa fenol sebesar 0,208 mg/ml dan flavonoid sebesar 0,010 mg/ml.

B. Saran

Pada penelitian ini terdapat kendala sumber eksplan yaitu adanya trikoma yang sangat besar pada seluruh bagian organ tanaman *E.scaber*, karena itu diperlukan kajian bagi tanaman yang dijadikan sumber eksplan untuk kultur jaringan yang mempunyai kendala sejenis.

DAFTAR PUSTAKA

- Abraham J.T.Dennis Thomas.2015.Plant regeneration from Organogenic callus and Assesment o Clonal fidely in *E.scaber* Linn an Etnomedical Herb. *Physiol. Mol. Biol.Plant* 21(2): 269-277.
- Angelova Z., S. Georgiev, and W. Roos. 2006. Elicitation of plants. *Journal of Biotechnol & Biotechnol.* **20** (2): 72-79.
- Altieri N and Altieri A. 2004. Agroecological Bases of Ecological Engineering for Pest Management .New York:C.Pub.Associates.
- Chawla. 1996. *Plant Tissue Culture : Theory and Practice*, A Revised Edition.
- Estrada, Karla-Ramirez., Heriberto Vidal-Limon, Diego Hidalgo, Elisabeth Moyano, Marta Golenioswki, Rosa M. Cusido, Javier Palazon. 2016. Elicitation, an Effective Strategy for the Biotechnological Production of Bioactive High-added Value Compounds in Plant Cell Factories. *Molecules.* 2016,21,182.
- Harborne, J.B. 1987. Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan. Bandung : ITB.
- Hernandez, X.E. 2005. Effects of elicitor and Copper sulfate on Grindelic acid production in submerged cultures of *Grindelia pulchella*. *Electronic Journal of Biotechnology* **8** (3): 277-282.
- Hidayati, Nur, Yuliani, N.Kuswanti. 2013. Pengaruh ekstrak daun Suren dan Mahoni (Famili meliaceae) terhadap mortalitas *Plutella xylostella*. Skripsi tidak dipublikasikan. Unesa
- Jedinak, A., J. Farago, I. Psenakova, and T. Maliar. 2004. Approaches to flavonoid production in plant tissue cultures. *Biologia, Bratislavia*, **59**(6): 697-710
- Kalshoven, L.G.E. 1981. The Pest of Crops in Indonesia. Jakarta : PT. Ichtiar Baru – Van Hoeve.
- Lakshmanan, S.K. Krishnappa, and K. Elumalai. 2012. Certain Plant Essential Oils Againts Antifeedant Activity of *Spodoptera litura* (Fab.),*Helicovetpa Armigera* (Hub.) and *Acheae Janata* (Linn.) (Lepidoptera:Noctuidae). *International Journal of Current Life Sciences.* **2** (1):5-11.
- Li, Wang, Shuguang Jian, Peng nan, and Yang Zhong. 2004. Chemical Composition of the Essential Oil of *E. scaber* from Southern China.*Naturforsch* 59c : 327-329.
- Mazid, M, Khan TA, and Mohammad F. 2011. Role of Secondary Metabolites in Defense Mechanisms of Plants. *Biology and Medicine* **3** (2): 232-249
- Mulabagal. 2004. Plant cell culture – an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabollites. *International Journal of Applied Science and Engineering.* **2** (1): 29-48.
- Mohan,V.R., P.Chenthurpandy and Kalidass. 2010. Pharmacognostic and Phytochemical Investigation of *E. scaber* L.(Asteraceae). *Journal of Pharmaceutical Science and Technology* **2**(3) 191-197.
- Namdeo A.G. 2007. Plant cell elicitation for production of secondary metabollites. *An review Article of Pharmacognosy.* **1** (1): 69-77.
- Ningsih, Yuliani, Haryono T, 2012. Pengaruh filtrate umbi gadung, daun sirsak, dan daun anting-anting terhadap mortalitas *Spodoptera litura*. Skripsi tidak dipublikasikan. Unesa
- Pedigo, Larry P. 1989. Entomology and Pest Management. New York : Macmillan Publishing Company.

- Radman, R., Teresa S., Christopher B dan Tajalli K. 2003. Review elicitation of plants and microbial cell systems. *Biotechnol. Appl. Biochem.* (37): 91-102.
- Robinson, Trevor. 1995. Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi. Bandung : ITB.
- Roberts, S. C. and Shuler M. L. 1997. Large scale plant cell culture. *Current Opinion in Biotechnology.* (8):154-159.
- Robins R. J. 1994. *Secondary Product from Cultured Cell Culture and Organs: I. Molecular and Cellular Approach. Plant Cell Cultures. A Practical Approach.* Second edition, Oxford University press. New York. p.169-198.
- Rukmana, R dan U.U. Sugandi. 1997. *Hama Tumbuhan dan Teknik Pengendalian.* Yogyakarta: Kanisius.
- Sudirga, S.K. 2002. Peningkatan kandungan azadirachtin dalam kultur suspensi sel *Azadirachta indica* A. Juss melalui elisitasi *S. Cerevisiae*. *JBPTITBBI*.
- Sukmaningrum, A. 2006. Pengaruh ion logam Co^{2+} , Cu^{2+} , dan Mn^{2+} terhadap akumulasi isoflavon pada kalus bengkuang (*Pachyrrhizus erosus* (L.) Urb.) *Skripsi.* Jurusan Kimia FMIPA, Universitas Brawijaya. Malang.
- Thanonkeo. 2006. Production of isoflavone, daidzein and genistein in callus cultures of *Prueraria candollei* Wall. Ex-Benth. Var. Mirifica. *Journal Science Technology.* 28 (1): 45-53.
- Tumova, L., Rimakova, J. Tuma dan J. Dusek. 2007. *Glicirrhiza glabra* culture In vitro-saponin production. *SLP-Adria Scientific Workshop* (267): 1233-1236 Uchiyama T, Miyase T, Ueno A, Usmanghani K (1989) Terpenic Glycosides from *Pluchea-Indica*. *Phytochemistry* (Oxford) 28, 3369-72.
- Wan Yong Ho, Huynh Ky, Swee Keong Yeap, Raha Abdul Rahim, Abdul Rahman Omar, Chai Ling Ho and Noorjahan Banu Alitheen. 2009. Traditional Practice, Bioactivities and Commercialization Potential of *E. scaber* Linn. *Journal of Medicinal Plants Research.* 3(13):1212-1221.
- Wink, Michael. 2010. Biochemistry of Plant Secondary Metabolism. Annual Plant Review. Vol 40. Heidelberg: Wiley Blackwell.
- Young, W., Yaoung, S.P., Yongki P. dan Jin-Kwon, A. 2006. Aluminium chloride enhances colchicine production in root culture of *Gloriosa superba*. *Biotechnology Letter* (28): 497-503.
- Yu O. and Brian M. 2003. Metabolic engineering of isoflavone biosynthesis. *Journal of Experimental Botany* 52 (357): 681-689.
- Yuliani, Evie Ratnasari, Herlina Fitrihidajati. 2008. Potensi Senyawa Alelokemi daun *Pluchea indica* (L.) Less sebagai Penghambat Perkecambahan Biji Gulma secara Hayati. Berkala Penelitian Hayati (Journal of Biological Researches) 3 A.
- Yuliani. 2013. Kajian Senyawa fenolik tanaman Asteraceae Pada Berbagai ketinggian habitat dan potensinya sebagai Biopestisida. Laporan Penelitian Hibah Doktor. LPPM. Unesa
- Yuliani dan Lisa Lisdiana. 2015. Pengembangan Biopestisida dari flora Lokal untuk meningkatkan Kualitas Agroekosistem Sawah padi Organik. Laporan penelitian Hibah Fundamental. LPPM Unesa.