

IDENTIFIKASI POLIFENOL PADA KULTUR *IN VITRO* KALUS *Camellia sinensis* UNTUK BAHAN MINUMAN FUNGSIONAL

(Identification of polyphenols in in vitro culture of *camellia sinensis* callus
as functional beverage)

Sutini*)

Jurusan Agroteknologi F.P. UPN 'Veteran' Jatim Surabaya.

Email :tien_basuki@yahoo.com

Abstract

Polyphenol included secondary bioactive metabolite had a function to reduce degenerative syndrome. Polyphenol contained in tea act as bioactive synthesis from hydroksil part and could be act as functional drinking and control human organ as biological metabolism. Problem in gain polyphenol product from tea plantation / *camellia sinensis* L for instance : depend on season, need a large area for cultivation, and low contain for productivity. For these purpose there were main idea to increase polyphenol productivity by mean of in vitro culture technique. These technique could reduce all problem above. The main purpose of these research were to find production technique by mean callus culture. Method to gain the purpose were : (1) callus induction by cultivate part of tea leaves in many variance grown culture , (2) Sub culture callus using same culture media as callus induction (3) Morphological check for callus (4) Kualitative analisis callus polyphenol. Result of these research were callus with hand time retention (tR) on High Performace Liquid Chromatography for 14 minutes with a same time of standart polyphenol. Polyphenol had potential to support the retention of functional beverage.

Key words : Polyphenols, in vitro culture of callus , *Camellia sinensis*

Abstrak

Polifenol termasuk senyawa bioaktif metabolit sekunder berguna diantaranya untuk mengatasi penyakit degeneratif. Polifenol dalam teh bertindak sebagai senyawa bioaktif karena memiliki gugus hidroksil dan dapat sebagai kandidat minuman fungsional. Termasuk minuman fungsional karena dapat mengatur metabolisme tubuh secara biologis. Kendala memperoleh Polifenol dari tanaman teh / *Camellia sinensis* diantaranya: sangat tergantung musim, memerlukan lahan yang luas, dan tingkat produksinya relatif rendah. Oleh karena itu produksi polifenol perlu dikembangkan dengan teknik kultur *in vitro*. Teknik ini dapat mengatasi kendala-kendala tersebut di atas. Tujuan penelitian secara umum adalah memperoleh teknik produksi polifenol secara in vitro melalui teknik kultur kalus. Metode yang dilakukan untuk mencapai tujuan tersebut adalah: (1) induksi kalus dengan menanam eksplan potongan pucuk daun teh pada media dengan berbagai zat pengatur tumbuh, (2) Sub kultur kalus menggunakan media yang sama seperti saat induksi (3) Pemeriksaan morfologis kalus. (4) Analisis kualitatif senyawa polifenol kalus. Hasil penelitian ini berupa kalus yang memiliki waktu retensi (t_R) pada High-Performance Liquid Chromatography selama 14 menit yang sama dengan waktu retensi polifenol standar. Senyawa polifenol ini berpotensi menunjang ketahanan minuman fungsional.

Kata kunci: Polifenol, kultur kalus *in vitro*, *Camellia sinensis*

PENDAHULUAN

Teh (*Camellia sinensis* L) diantaranya mengandung komponen bioaktif polifenol, berperan besar dalam pencegahan berbagai macam penyakit. Polifenol teh dalam mencegah berbagai penyakit bekerja dalam tiga cara. Pertama, polifenol mencegah radikal bebas merusak DNA dan menghentikan perkembangan sel-sel liar yang akan berkembang menjadi kanker dan meningkatkan system imun (Nindia Dewi, 2008). Kedua, polifenol mengontrol pertumbuhan sel-sel yang tak terkendali dan menghambat perkembangan kanker. Ketiga, polifenol tertentu dapat menghancurkan kanker tanpa merusak sel-sel di sekitarnya. Hasil penelitian Sibuea (2007) menyatakan bahwa teh dapat dikategorikan sebagai minuman fungsional karena mengandung senyawa aktif yaitu flavonoid /polifenol (Caffin, 2004) yang mampu berperan sebagai antioksidan alami, menjaga tubuh dari serangan radikal bebas. Kendala ketersediaan polifenol teh dari tanaman dipengaruhi: musim, curah hujan, suhu 24.4°C (Williges, 2004), kadar senyawa yang relatif rendah sekitar 1-3 % (Ruan, 2005) memerlukan lahan luas, memerlukan pemeliharaan intensif seperti penyiangan, pemangkasan, pemberantasan gulma, pemberantasan hama-penyakit (Setiti Edy, 2000) sehingga biaya pembudidayaan akan mahal. Oleh karena itu produksi metabolit sekunder bioaktif polifenol perlu dikembangkan dengan teknik kultur *in vitro*. Teknik kultur *in vitro* mempunyai keuntungan dalam produksi metabolit dibandingkan dengan tanaman utuh karena kecepatan pertumbuhan sel dan biosintesis dalam kultur yang diinisiasi dari eksplan sangat tinggi dan dalam periode yang sangat singkat. Beberapa keuntungan dari pemakaian teknik kultur *in vitro* untuk produksi metabolit sekunder antara lain: tidak tergantung musim, sistem produksi dapat diatur sesuai kebutuhan, lebih konsisten, dan mengurangi penggunaan lahan (Watimena, 1992). Kultur *in vitro* juga lebih ekonomis untuk tanaman yang memerlukan waktu lama untuk mencapai kemasakan fisiologis. Penelitian ini

bertujuan untuk mengidentifikasi polifenol dari teknik kultur *in vitro* sebagai upaya untuk mendapatkan bahan bioaktif yang berperan untuk menunjang keberadaan minuman fungsional

BAHAN dan METODE

Bahan jaringan daun muda dan kalus *Camellia sinensis* L, media Murashige & Skoog (MS), 2.4-diklorofenoksi-asetat (2,4D), kinetin, etanol, Na-hypoklorit, akuades steril, larutan banlate 5%. Untuk ekstraksi: metanol, akuades, kloroform, etil asetat. Untuk HPLC: asam asetat, metanol-aqua pro injeksi (15:85)

Alat-alat yang digunakan diantaranya:

(1) High-performance liquid chromatography (HPLC) Agilent 1100 series low pressure gradient dengan detektor Spektrofotometer UV-ST diode array, kolom RP-18 Waters μ Bondapak 10 μ m, 3.3 x 300mm. (2) Neraca analitik *Direct Reading micro Balance* (Shimadzu), kepekaan 0,001 mg dan "Nylon membran filter" 0,2 μ m

Metode Penelitian

Eksplan dipetik dari pucuk daun teh posisi 1, 2, 3 (Simanjuntak, T, 2004) dicuci dengan air yang mengalir selama sepuluh menit. Sterilisasi direndam sambil dikocok pelan dalam larutan 5,25% NaOCl 30 menit. Dibilas dengan akuades steril, sambil dikocok pelan 5 menit, pembilasan diulangi 3 kali. Dipindahkan pada cawan petri, hilangkan tulang dan tepi daun, kemudian potong-potong ukuran 0,5-1 cm untuk induksi kalus. Potongan ditanam sebanyak 4-5 eksplan. Botol kultur diinkubasi di ruang suhu 25°C, kalus yang terbentuk disubkultur untuk memperbanyak jumlah kalus.

Kalus dipotong menjadi 4-5 bagian dan dipindahkan pada media baru secara aseptis, diinkubasi dalam ruang suhu 25°C selama 4 minggu dengan pencahayaan. Setelah 4 minggu kalus dipilih yang berwarna putih kehijauan kemudian dipanen. Setelah dipanen dilakukan identifikasi kalus secara kualitatif. Identifikasi dilakukan secara mikroskopis, dan identifikasi menggunakan High-performance liquid chromatography (HPLC). Kromatogram HPLC berupa

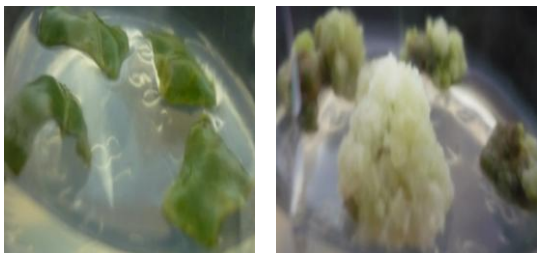
waktu retensi (t_R) standar polifenol dan waktu retensi kalus polifenol. Sebelum identifikasi menggunakan HPLC dilakukan ekstraksi menggunakan methanol. Ekstraksi dengan cara dilarutkan dalam metanol (Thomson Leonor 2004) disonikasi selama 5 menit untuk menghilangkan gas-gas yang terdapat dalam larutan agar tidak menyumbat kolom, kemudian larutan disaring dengan membran filter Whatmann 0,2 μm . Untuk memperjelas puncak kromatogram, pada larutan kalus ditambahkan standar polifenol 15 ppm. Sampel dan standar disuntikkan sebanyak 20 μL pada HPLC. Kondisi operasional HPLC: (1) Suhu diseting 30°C, (2) Panjang gelombang 274,8 nm (Peter, 2002), (3) Detector: *Diode Array Detector* (4) Fase gerak terdiri dari methanol 20%- air 75 %- asam asetat 5 %, (5) Aliran fase gerak 1 ml / menit, (6) Kolom :RP C-18 *u* Bondopak.

HASIL dan PEMBAHASAN

Hasil

Morfologi kalus

Setelah induksi, morfologi kalus terbentuk pada tepi yang dipotong kemudian melebar keseluruhan permukaan eksplan. Hasil induksi kalus dari daun teh dengan media MS ditambah zat pengatur tumbuh auksin dan sitokinin (Sutini 2008) dapat dilihat pada Gambar 1.

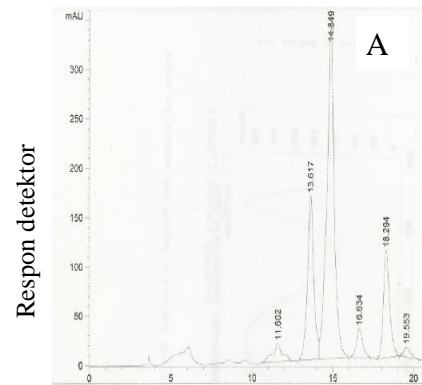


Gambar 1. Morfologi kalus teh dengan media MS + auksin dan sitokinin umur 4 minggu kalus terbentuk pada tepi yang dipotong kemudian melebar hampir keseluruhan permukaan eksplan.

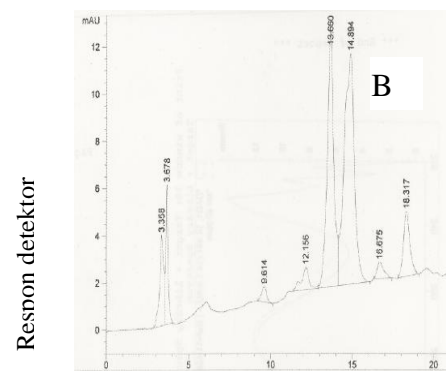
Umur 4 minggu dari masa

Analisis kualitatif polifenol kalus.

Analisis kualitatif polifenol dengan High-performance liquid chromatography. Hasil analisis kualitatif kalus polifenol dapat dilihat pada pada Gambar 2 B dan pengamatan standar dapat dilihat pada pada Gambar 2 A.



Waktu retensi / t_R (menit)

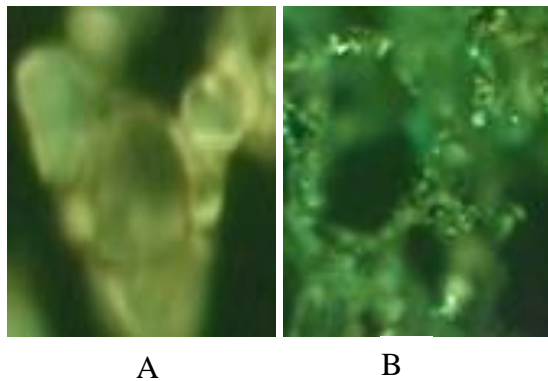


Waktu retensi / t_R (menit)

Gambar2:(A)Kromatogram polifenol standar, (B) Kromatogram polifenol kalus

Pengamatan Morfologis

Pengamatan morfologis secara mikroskopis menggunakan mikroskop fluoresen, cahaya UV (λ 2500-4000 \AA) perbesaran 400 \times (Widyarti Sri, 2007) tampak bentuk sel standar polifenol hampir sama dengan bentuk sel dari kalus (Gambar 3 A-B).



Gambar 3. Pengamatan morfologis dengan mikroskop fluoresen perbesaran 400x: (A)morfologis sel polifenol standar, (B) morfologis sel polifenol kalus

PEMBAHASAN

Gambar 1, tampak eksplan daun menggelembung mulai dari tepi eksplan yang terpotong hal ini disebabkan tepi yang terpotong mengambil nutrisi dari media untuk membentuk kalus, hingga seluruh eksplan membentuk kalus secara keseluruhan.

Gambar 2, Pada kromatogram tampak waktu retensi standar sepanjang 14, 84 menit dan kalus sepanjang 14, 89 menit terdapat selisih 5 detik hal ini dikarenakan pada kalus kemungkinan masih terdapat senyawa lain misalnya kafein.

Senyawa utama yang terkandung di dalam teh adalah polifenol (Anonimous. 2010) dan banyak memiliki gugus fungsi hidroksil. Lima fungsi yang dipenuhi oleh polifenol dalam teh, sehingga berpotensi menjadi minuman fungsional (Anonimous. 2010) yaitu: (1) Teh akan meningkatkan sistem pertahanan biologis tubuh terhadap kanker. (2) Teh mencegah timbulnya penyakit, seperti mengendalikan diabetes dan tekanan darah tinggi. (3) Teh membantu penyembuhan penyakit, misalnya mencegah peningkatan kolesteroldarah. (4) Teh dapat mengatur gerak fisik tubuh dengan mengaktifkan sistem saraf. (5) Katekin teh merupakan antioksidan yang kuat dan akan menghambat proses penuaan.

KESIMPULAN

Diperoleh waktu retensi (t_R) standar polifenol dan ekstrak kalus antara 14.84-14.89, harga waktu retensi (t_R) hampir sama yaitu sekitar 14 menit, dapat disimpulkan bahwa ekstrak kalus mengandung polifenol.

UCAPAN TERIMA KASIH

Kepada: 1. DP2M Ditjen Dikti telah mendanai Hibah bersaing ini TH 2006/2008. 2. Teman-teman di Laboratorium F. Farmasi Unair. 3. Teman-teman di Laboratorium F.Pertanian Unibraw.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonimous. 2010. Prospek Teh Indonesia Sebagai Minuman Fungsional.<http://blog.ub.ac.id/devydhua/2010/05/29/prospek-teh-indonesia-sebagai-minuman-fungsional/>. (25 April 2012).
- Anonimous. 2010. Teh hijau (green tea) <http://wartawarga.gunadarma.ac.id/2010/01/teh/>. (25 April 2012).
- Caffin, N., B. D'Arcy, L. Yao, and G. Rintoul. 2004. Developing an index of quality for Australian tea, Rural Industries Research and Development Corporation, <http://www.rirdc.gov.au>
- Nindia Dewi, VA. 2008. Pengaruh Pemberian Polifenol Teh Hijau terhadap Sebukan Sel Mononuklear Adenokarsinoma. *Mammae Mencit C3H. Skripsi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang*
- Peter W.L. 2002. Biochemical analysis for identification of quality in black tea (*Camellia sinensis*). *Disertasi. Faculty of Natural and Agricultural Sciences. Departement of Biochemistry. University of Pretoria. Pretoria. South Africa*, p. 42.

- http://upetd.up.ac.za/thesis/available/etd-03012005_084935/unrestricted/00dissertation.pdf
- Simanjuntak, T. 2004. Pemanfaatan Pengetahuan Bioteknologi pada Teh hijau, Cakrawala Medan.
- Setiti E, 2000. Prospek Aplikasi Teknik Kultur Jaringan Dalam Agrobisnis. Prospek Agrobisnis Menyongsong Otonomi Daerah. Prosiding Fakultas MIPA Unair Surabaya, p. 1-6.
- Sibuea P. 2007. Minum Teh dan Khasiatnya Bagi Kesehatan, <http://www.sinarharapan.co.id>.
- Sutini, 2008. Meningkatkan Produksi Flavan-3-ol Melalui kalus *Camellia sinensis* L dengan Elisitor CU 2+. *Journal of Biological Researches* (14):39-44
- Thomson Leonor. 2004. Enrichment of Biologically Active Compounds from Selected Plants Using Adsorptive Bubble Separation, *Dissertation Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt Technischen Universität München*.
<http://www.google.co.id/search?hl=id&q=production+catechin++from+callus+camellia+sinensis+leaf+pdf+%2Bfree+purchase+research+&meta=>
- Watimena, GA, 1992. Bioteknologi Tanaman. Pusat antar Universitas. IPB Bogor.
- Widyarti Sri, 2007. Memisahkan Komponen Seluler Sel Tanaman Dengan Sentrifusi. Petunjuk praktikum. Bioteknologi. Universitas Brawijaya.
- Williges, U. 2004. Status of organic agriculture in Sri Lanka with special emphasis on tea production systems (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze). *Disertasi. Faculty of Plant Production, Justus-Liebig-University of Giessen. P. 4*.
<http://geb.unigiessen.de/geb/volltexte/2005/2315/pdf/WilligesUte-2005-02-10.pdf>.