



**KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN,
RISET DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS MULAWARMAN
LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT**

Alamat : Jl. Krayan No. 1 Gedung A8, Kampus Gunung Kelua, Samarinda 75123

Laman : <http://lp2m.unmul.ac.id> Surel: lppm@unmul.ac.id

**Surat Pernyataan
No. 1488/ UN.17/ TU/ 2024**

Yang bertanda tangan di bawah, Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Universitas Mulawarman :

Nama : Prof. Widi Sunaryo, S.P., M.Si., Ph.D
NIP : 197304021999031002
NIDN/ NIDK/ NUPTK : 0002047306
Satuan Ikatan Kerja : Dosen Tetap
Pangkat/ Gol Ruang TMT : Guru Besar/ IVa/ Oktober 2023
Jabatan, TMT : Ketua LP2M Unmul/ 2022

Memberikan pernyataan kepada :

Nama : Dr. Yanti Puspita Sari, M.Si.
NIP : 197403042000122001
NIDN/ NIDK/ NUPTK : 000403740
Satuan Ikatan Kerja : Dosen Tetap
Tempat Tanggal Lahir : Padang, 4 Maret 1974
Pangkat/ Gol.Ruang, TMT : Pembina/ IVa/ 01 Oktober 2013
TMT : Lektor Kepala, 01 April 2011
Pendidikan Tertinggi : S3
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jurusan/ Program Studi : Biologi/ S1 Biologi


Bahwa yang bersangkutan di atas adalah benar melaksanakan penelitian pada Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat (LP2M) Universitas Mulawarman, bertindak sebagai Ketua Peneliti dan dibiayai oleh :

1. Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat Direktorat Jenderal Penguatan Riset dan Pengembangan Kementerian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi sesuai dengan Kontrak Penelitian Nomor : 359/ UN17.41/ KL/ 2017. Skema Penelitian : Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi dengan judul : "Potensi Ekstrak Kalus Tanaman Sarang Semut (*Myrmecodia Tuberosa Jack*)". Tahun Pertama. Besar dana Penelitian : Rp. 112.965.000 (seratus dua belas juta Sembilan ratus enam puluh lima juta rupiah). Laporan Penelitian terdokumentasi dengan baik di LP2M Universitas Mulawarman.

2. Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat Direktorat Jenderal Penguatan Riset dan Pengembangan Kementerian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi sesuai dengan Kontrak Penelitian Nomor : 071/ UN17.41/ KL/ 2018.. Skema Penelitian : Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi dengan judul : “Potensi Ekstrak Kalus Tanaman Sarang Semut (*Myrmecodia Tuberosa* Jack)”. Tahun kedua. Besar dana Penelitian : Rp. 135.000.000 (seratus tiga puluh lima juta rupiah). Laporan Penelitian terdokumentasi dengan baik di LP2M Universitas Mulawarman.

Demikian surat pernyataan ini dibuat dan diberikan untuk memenuhi syarat pengusulan jabatan Fungsional Guru Besar yang bersangkutan.

Samarinda, 09 Oktober 2024
Ketua LP2M Unmul,



Prof. Widi Sunaryo, S.P., M.Si., Ph.D
NIP. 197304021999031002



12

KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN
TINGGI
UNIVERSITAS MULAWARMAN
LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA
MASYARAKAT

Alamat : Jl. Kerayan No. 1 Gedung A 20 Kampus Gn. Kelua Samarinda 75119
Telp./Fax. (0541)741033, 748482, e-mail : lp2m@unmul.ac.id website : <http://www.lp2m.unmul.ac.id>

KONTRAK PENELITIAN
Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi
Tahun Anggaran 2017
Nomor: 359/UN17.41/KL/2017

Pada hari ini Senin tanggal Sepuluh bulan April tahun Dua Ribu Tujuh Belas, kami yang bertandatangan dibawah ini :

1. **SUSILO** : Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat, Universitas Mulawarman, dalam hal ini bertindak untuk dan atas nama Universitas Mulawarman, yang berkedudukan di Jalan Kerayan no. 1 Kampus Gn. Kelua Samarinda, untuk selanjutnya disebut **PIHAK PERTAMA**;
2. **YANTI PUSPITA SARI** : Dosen Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Mulawarman, dalam hal ini bertindak sebagai pengusul dan Ketua Pelaksana Penelitian Tahun Anggaran 2017 untuk selanjutnya disebut **PIHAK KEDUA**.

PIHAK PERTAMA dan **PIHAK KEDUA**, secara bersama sama sepakat mengikatkan diri dalam suatu Kontrak Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi Tahun Anggaran 2017 denganketentuan dan syarat syarat sebagai berikut:

Pasal 1
Ruang Lingkup Kontrak

PIHAK PERTAMA memberi pekerjaan kepada **PIHAK KEDUA** dan **PIHAK KEDUA** menerima pekerjaan tersebut dari **PIHAK PERTAMA**, untuk melaksanakan dan menyelesaikan Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi Tahun Anggaran 2017 dengan judul "**POTENSI EKSTRAK KALUS TANAMAN SARANG SEMUT (*Myrmecodia tuberosa* Jack) HASIL IN VITRO SEBAGAI ANTIOKSIDAN DAN ANTIMIKROBA**".

Pasal 2
Dana Penelitian

- (1) Besarnya dana untuk melaksanakan penelitian dengan judul sebagaimana dimaksud pada Pasal 1 adalah sebesar Seratus Dua Belas Juta Sembilan Ratus Enam Puluh Lima Ribu Rupiah sudah termasuk pajak.
- (2) Dana Penelitian sebagaimana dimaksud pada ayat (1) dibebankan pada Daftar Isian Pelaksanaan Anggaran (DIPA) Direktorat Jenderal Penguatan Riset dan Pengembangan, Kementerian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi Nomor SP DIPA-042.06.1.401516/2017, tanggal 06 Desember 2016.

12

Pasal 3
Tata Cara Pembayaran Dana Penelitian

- (1) **PIHAK PERTAMA** akan membayarkan Dana Penelitian kepada **PIHAK KEDUA** secara bertahap dengan ketentuan sebagai berikut:
- a. Pembayaran Tahap Pertama sebesar 70% dari total dana penelitian yaitu 70% x Rp. 112.965.000 = Rp. 79.075.500 (*Tujuh Puluh Sembilan Juta Tujuh Puluh Lima Ribu Rupiah*), yang akan dibayarkan oleh **PIHAK PERTAMA** kepada **PIHAK KEDUA** setelah **PARA PIHAK** membuat dan melengkapi rancangan pelaksanaan penelitian yang memuat judul penelitian, pendekatan dan metode penelitian yang digunakan, data yang akan diperoleh, anggaran yang akan digunakan, dan tujuan penelitian berupa luaran yang akan dicapai.
 - b. Pembayaran Tahap Kedua sebesar 30% dari total dana penelitian yaitu 30% x Rp. 112.965.000 = Rp. 33.889.500 (*Tiga Puluh Tiga Juta Delapan Ratus Delapan Puluh Sembilan Ribu Lima Ratus Rupiah*), dibayarkan oleh **PIHAK PERTAMA** kepada **PIHAK KEDUA** setelah **PIHAK KEDUA** mengunggah ke SIMLITABMAS yaitu Laporan Kemajuan Pelaksanaan Penelitian dan Catatan Harian.
 - c. Biaya tambahan dibayarkan kepada **PIHAK KEDUA** bersamaan dengan pembayaran Tahap Kedua dengan melampirkan Daftar luaran penelitian yang sudah divalidasi oleh **PIHAK PERTAMA**.
- (2) Dana Penelitian sebagaimana dimaksud pada ayat (1) akan disalurkan oleh **PIHAK PERTAMA** kepada **PIHAK KEDUA** ke rekening sebagai berikut:

Nama : YANTI PUSPITA SARI
Nomor Rekening : 0216507006
Nama Bank : BNI
BNI

- (3) **PIHAK PERTAMA** tidak bertanggung jawab atas keterlambatan dan/atau tidak terbayarnya sejumlah dana sebagaimana dimaksud pada ayat (1) yang disebabkan karena kesalahan **PIHAK KEDUA** dalam menyampaikan data peneliti, nama bank, nomor rekening, dan persyaratan lainnya yang tidak sesuai dengan ketentuan.

Pasal 4
Jangka Waktu

Jangka waktu pelaksanaan penelitian sebagaimana dimaksud dalam Pasal 1 sampai selesai 100%, adalah dihitung sejak **Tanggal 10 April 2017** dan berakhir pada **Tanggal 31 Oktober 2017**

Pasal 5
Target Luaran

- (1) **PIHAK KEDUA** berkewajiban untuk mencapai target luaran wajib penelitian berupa Publikasi Ilmiah Jurnal Internasional.
- (2) **PIHAK KEDUA** diharapkan dapat mencapai target luaran tambahan penelitian berupa 1. Publikasi Ilmiah Jurnal Nasional Terakreditasi 2. Buku Ajar.
- (3) **PIHAK KEDUA** berkewajiban untuk melaporkan perkembangan pencapaian target luaran sebagaimana dimaksud pada ayat (1) kepada **PIHAK PERTAMA**.

Pasal 6
Hak dan Kewajiban Para Pihak

- (1) Hak dan Kewajiban **PIHAK PERTAMA**:
 - a. **PIHAK PERTAMA** berhak untuk mendapatkan dari **PIHAK KEDUA** luaran penelitian sebagaimana dimaksud dalam Pasal 7;

- 12
- b. **PIHAK PERTAMA** berkewajiban untuk memberikan dana penelitian kepada **PIHAK KEDUA** dengan jumlah sebagaimana dimaksud dalam Pasal 2 ayat (1) dan dengan tata cara pembayaran sebagaimana dimaksud dalam Pasal 3.

(2) Hak dan Kewajiban **PIHAK KEDUA**:

- a. **PIHAK KEDUA** berhak menerima dana penelitian dari **PIHAK PERTAMA** dengan jumlah sebagaimana dimaksud dalam Pasal 2 ayat (1);
- b. **PIHAK KEDUA** berkewajiban menyerahkan kepada **PIHAK PERTAMA** luaran Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi dengan judul POTENSI EKSTRAK KALUS TANAMAN SARANG SEMUT (*Myrmecodia tuberosa* Jack) HASIL IN VITRO SEBAGAI ANTIOKSIDAN DAN ANTIMIKROBA dan catatan harian pelaksanaan penelitian;
- c. **PIHAK KEDUA** berkewajiban untuk bertanggungjawab dalam penggunaan dana penelitian yang diterimanya sesuai dengan proposal kegiatan yang telah disetujui;
- d. **PIHAK KEDUA** berkewajiban untuk menyampaikan kepada **PIHAK PERTAMA** laporan penggunaan dana sebagaimana dimaksud dalam Pasal 7.

Pasal 7

Laporan Pelaksanaan Penelitian

- (1) **PIHAK KEDUA** berkewajiban untuk menyampaikan kepada **PIHAK PERTAMA** berupa laporan kemajuan dan laporan akhir mengenai luaran penelitian dan rekapitulasi penggunaan anggaran (melampirkan bukti setor pajak yang telah dibayarkan) sesuai dengan jumlah dana yang diberikan oleh **PIHAK PERTAMA** yang tersusun secara sistematis sesuai pedoman yang ditentukan oleh **PIHAK PERTAMA**.
- (2) **PIHAK KEDUA** berkewajiban mengunggah Laporan Kemajuan dan Catatan harian penelitian yang telah dilaksanakan ke SIMLITABMAS paling lambat **30 Agustus 2017**.
- (3) **PIHAK KEDUA** berkewajiban menyerahkan *Hardcopy* Laporan Kemajuan dan Rekapitulasi Penggunaan Anggaran 70% kepada **PIHAK PERTAMA**, paling lambat **8 September 2017**.
- (4) **PIHAK KEDUA** berkewajiban mengunggah Laporan Akhir, capaian hasil, Poster, artikel ilmiah dan profil pada SIMLITABMAS paling lambat **31 Oktober 2017** (bagi penelitian tahun terakhir).
- (5) Laporan hasil Penelitian sebagaimana tersebut pada ayat (4) harus memenuhi ketentuan sebagai berikut:
 - a. Bentuk/ukuran kertas A4;
 - b. Di bawah bagian cover ditulis:

Dibiayai oleh:

**Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat
Direktorat Jenderal Penguatan Riset dan Pengembangan
Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi
Sesuai dengan Kontrak Penelitian
Nomor: 359/UN17.41/KL/2017**

Pasal 8
Monitoring dan Evaluasi

PIHAK PERTAMA dalam rangka pengawasan akan melakukan Monitoring dan Evaluasi internal terhadap kemajuan pelaksanaan Penelitian Tahun Anggaran 2017 ini sebelum pelaksanaan Monitoring dan Evaluasi eksternal oleh Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat, Direktorat Jenderal Penguatan Riset dan Pengembangan, Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi.

Pasal 9
Penilaian Luaran

1. Penilaian luaran penelitian dilakukan oleh Komite Penilai/*Reviewer* Luaran sesuai dengan ketentuan yang berlaku.
2. Apabila dalam penilaian luaran terdapat luaran tambahan yang tidak tercapai maka dana tambahan yang sudah diterima oleh peneliti harus disetorkan kembali ke kas negara.

Pasal 10
Perubahan Susunan Tim Pelaksana dan Substansi Pelaksanaan

Perubahan terhadap susunan tim pelaksana dan substansi pelaksanaan Penelitian ini dapat dibenarkan apa bila telah mendapat persetujuan tertulis dari Direktur Riset dan Pengabdian Masyarakat, Direktorat Jenderal Penguatan Riset dan Pengembangan, Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi.

Pasal 11
Penggantian Ketua Pelaksana

- (1) Apabila **PIHAK KEDUA** selaku ketua pelaksana tidak dapat melaksanakan Penelitian ini, maka **PIHAK KEDUA** wajib mengusulkan pengganti ketua pelaksana yang merupakan salah satu anggota tim kepada **PIHAK PERTAMA**.
- (2) Apabila **PIHAK KEDUA** tidak dapat melaksanakan tugas dan tidak ada pengganti ketua sebagaimana dimaksud pada ayat(1), maka **PIHAK KEDUA** harus mengembalikan dana penelitian kepada **PIHAK PERTAMA** yang selanjutnya disetor ke Kas Negara.
- (3) Bukti setor sebagaimana dimaksud pada ayat (2) disimpan oleh **PIHAK PERTAMA**.

Pasal 12
Sanksi

- (1) Apabila sampai dengan batas waktu yang telah ditetapkan untuk melaksanakan Penelitian ini telah berakhir, namun **PIHAK KEDUA** belum menyelesaikan tugasnya, terlambat mengirim laporan Kemajuan, dan/atau terlambat mengirim laporan akhir, maka **PIHAK KEDUA** dikenakan sanksi administratif berupa penghentian pembayaran dan tidak dapat mengajukan proposal penelitian dalam kurun waktu dua tahun berturut turut.
- (2) Apabila **PIHAK KEDUA** tidak dapat mencapai target luaran sebagaimana dimaksud dalam Pasal 5, maka kekurangan capaian target luaran tersebut akan dicatat sebagai hutang **PIHAK KEDUA** kepada **PIHAK PERTAMA** yang apabila tidak dapat dilunasi oleh **PIHAK KEDUA**, akan berdampak pada kesempatan **PIHAK KEDUA** untuk mendapatkan pendanaan penelitian atau hibah lainnya yang dikelola oleh **PIHAK PERTAMA**.

Pasal 13
Pembatalan Perjanjian

- (1) Apabila dikemudian hari terhadap judul Penelitian sebagaimana dimaksud dalam Pasal 1 ditemukan adanya duplikasi dengan Penelitian lain dan/atau ditemukan adanya ketidakjujuran, itikad tidak baik, dan/atau perbuatan yang tidak sesuai dengan kaidah ilmiah dari atau dilakukan oleh **PIHAK KEDUA**, maka perjanjian Penelitian ini dinyatakan batal dan **PIHAK KEDUA** wajib mengembalikan dana penelitian yang telah diterima kepada **PIHAK PERTAMA** yang selanjutnya akan disetor ke Kas Negara.
- (2) Bukti setor sebagaimana dimaksud pada ayat (1) disimpan oleh **PIHAK PERTAMA**.

Pasal 14
Pajak-Pajak

Hal hal dan/atau segala sesuatu yang berkenaan dengan kewajiban pajak berupa PPN dan/atau PPh menjadi tanggungjawab **PIHAK KEDUA** dan harus dibayarkan oleh **PIHAK KEDUA** ke kantor pelayanan pajak setempat sesuai ketentuan yang berlaku.

Pasal 15
Peralatan dan/atau alat Hasil Penelitian

Hasil Pelaksanaan Penelitian ini yang berupa peralatan dan/atau alat yang dibeli dari pelaksanaan Penelitian ini adalah milik Negara yang dapat dihibahkan kepada Universitas Mulawarman sesuai dengan ketentuan peraturan perundang undangan.

Pasal 16
Penyelesaian Sengketa

Apabila terjadi perselisihan antara **PIHAK PERTAMA** dan **PIHAK KEDUA** dalam pelaksanaan perjanjian ini akan dilakukan penyelesaian secara musyawarah dan mufakat, dan apabila tidak tercapai penyelesaian secara musyawarah dan mufakat maka penyelesaian dilakukan melalui proses hukum.

Pasal 17
Lain-lain

- (1) **PIHAK KEDUA** menjamin bahwa penelitian dengan judul tersebut di atas belum pernah dibiayai dan/atau diikutsertakan pada Pendanaan Penelitian lainnya, baik yang diselenggarakan oleh instansi, lembaga, perusahaan atau yayasan, baik di dalam maupun di luar negeri.
- (2) Segala sesuatu yang belum cukup diatur dalam Perjanjian ini dan dipandang perlu diatur lebih lanjut dan dilakukan perubahan oleh **PARA PIHAK**, maka perubahan perubahannya akan diatur dalam perjanjian tambahan atau perubahan yang merupakan satu kesatuan dan bagian yang tidak terpisahkan dari Perjanjian ini.

Perjanjian ini dibuat dan ditandatangani oleh PARA PIHAK pada hari dan tanggal tersebut di atas, dibuat dalam rangkap 2 (dua) dan bermeterai cukup sesuai dengan ketentuan yang berlaku, yang masing masing mempunyai kekuatan hukum yang sama.

PIHAK PERTAMA



PIHAK KEDUA

A blue ink signature is written in cursive over a faint circular stamp.

**YANTI PUSPITA SARI
NIDN: 0004037404**



Kesehatan (Penyakit Tropis dan Pemanfaatan Biodiversitas)

113/Biologi (dan Bioteknologi Umum)

**LAPORAN AKHIR TAHUN
PENELITIAN UNGGULAN PERGURUAN TINGGI**



**POTENSI EKSTRAK KALUS TANAMAN SARANG SEMUT
(*Myrmecodia tuberosa* Jack) HASIL *IN VITRO* SEBAGAI
ANTIOKSIDAN DAN ANTIMIKROBA**

Tahun ke 1 dari rencana 2 tahun

**YANTI PUSPITA SARI, M.Si: 0004037404
EKO KUSUMAWATI, S.Si, MP: 0013048209
Dr. CHAIRUL SALEH, M.Si: 0031037302**

**UNIVERSITAS MULAWARMAN
OKTOBER 2017**

**Dibiayai oleh:
Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat
Direktorat Jenderal Penguatan Riset dan Pengembangan
Kementerian Riset, Teknologi dan Perguruan Tinggi
Sesuai Dengan Kontrak Penelitian
Nomor: 359/UN17.41/KL/2017**

HALAMAN PENGESAHAN

Judul : POTENSI EKSTRAK KALUS TANAMAN SARANG SEMUT (*Myrmecodia tuberosa* Jack) HASIL IN VITRO SEBAGAI ANTIOKSIDAN DAN ANTIMIKROBA

Peneliti/Pelaksana
Nama Lengkap : Dr YANTI PUSPITA SARI, S.Si, M.Si
Perguruan Tinggi : Universitas Mulawarman
NIDN : 0004037404
Jabatan Fungsional : Lektor Kepala
Program Studi : Biologi
Nomor HP : 081253958381
Alamat surel (e-mail) : ypsman2002@yahoo.com

Anggota (1)
Nama Lengkap : EKO KUSUMAWATI S.Si, M.P
NIDN : 0013048209
Perguruan Tinggi : Universitas Mulawarman

Anggota (2)
Nama Lengkap : Dr. CHAIRUL SALEH
NIDN : 0031037302
Perguruan Tinggi : Universitas Mulawarman

Institusi Mitra (jika ada)
Nama Institusi Mitra : -
Alamat : -
Penanggung Jawab : -
Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 1 dari rencana 2 tahun
Biaya Tahun Berjalan : Rp 112,965,000
Biaya Keseluruhan : Rp 236,666,000

Mengetahui,
Dekan FMIPA UNMUL



(Dr. Eng. Idris Mandang, M. Si)
NIP/NIK 197110081998021001

Kota Samarinda, 21 - 10 - 2017
Ketua,

(Dr YANTI PUSPITA SARI, S.Si, M.Si)
NIP/NIK 197403042000122001

Menyetujui,
Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat



(Prof. Dr. Susilo, M.Pd)
NIP/NIK 197105122002121002

RINGKASAN

Tanaman sarang semut (*Myrmecodia tuberosa* Jack) merupakan tanaman obat yang mengandung senyawa aktif penting seperti flavonoid, tanin, tokoferol, fenolik dan kaya berbagai mineral yang sangat berguna sebagai antioksidan. Popularitas tanaman sarang semut yang melambung karena khasiatnya mengakibatkan keberadaan tanaman ini di alam menjadi terancam sehingga perlu upaya budidaya penyelamatan plasma nutfah tanaman tersebut. Metode kultur jaringan dapat digunakan sebagai alternatif untuk menghasilkan senyawa aktif seperti yang dimiliki oleh tanaman induk melalui sumber eksplan berupa kalus. Selain itu penambahan senyawa tertentu seperti sukrosa ke dalam media kultur dapat mempengaruhi kandungan metabolit sekunder yang dihasilkan oleh kalus. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui sumber eksplan (kotiledon, batang, umbi, akar) dan kombinasi zat pengatur tumbuh (0.5, 1, 1.5 2 mg/L 2,4 Diclorophenoxyacetic acid dan 2 mg/L Kinetin) terbaik dalam menghasilkan kalus dan mengetahui konsentrasi sukrosa yang paling baik (30, 60, 90 dan 120 gram) dalam menghasilkan metabolit sekunder pada kalus tanaman sarang semut yang dapat dilihat dari uji fitokimianya.

Hasil penelitian menunjukkan persentase kalus yang muncul pada setiap sumber eksplan yang digunakan dan perlakuan zpt yang diberikan adalah 100%. Kalus terbaik diperoleh pada sumber eksplan kotiledon dengan penambahan zat pengatur tumbuh 2 mg/L 2,4-D dan 2 mg/L kinetin dengan warna kalus hijau-hijau muda dengan tekstur remah serta ukuran kalus yang besar dibandingkan dengan perlakuan yang lain. Kandungan metabolit sekunder terbaik diperoleh pada kalus yang diberi perlakuan sukrosa 30 gram yang positif mengandung alkaloid, fenolik, flavonoid, saponin dan steroid.

Kata kunci : Kalus, *Myrmecodia tuberosa* Jack, 2.4-D, Kinetin, sukrosa, metabolit sekunder

PRAKATA

Assalamu'alaikum Wr.Wb

Alhamdulillahirabbil'alamin. Puji dan syukur kami panjatkan kepada Allah SWT, karena Rahmat dan Karunia-Nya kami dapat menyelesaikan laporan penelitian hibah PUPT yang berjudul "Potensi Ekstrak Kalus Tanaman Sarang Semut (*Myrmecodia Tuberosa* Jack) Hasil *In Vitro* sebagai Antioksidan Dan Antimikroba" tahun ke 1 dari 2 tahun dengan baik.

Selama melaksanakan penelitian ini, banyak sekali bantuan dan dukungan yang diperoleh. Untuk itu pada kesempatan ini, kami mengucapkan terima kasih kepada:

1. Kementrian Riset, Teknologi dan Perguruan Tinggi yang telah memberikan bantuan dana penelitian.
2. Prof. Dr. H. Masjaya, M.Si sebagai Rektor Universitas Mulawarman.
3. Prof. Dr. Susilo, M.Pd sebagai Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat Universitas Mulawarman.
4. Dr. Eng. Idris Mandang, M.Si sebagai Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
5. Dr. Chaerul Saleh, M.Si dan Eko Kusumawati, M.P sebagai anggota penelitian.
6. Berbagai pihak yang telah membantu selama penelitian ini.

Semoga hasil penelitian ini dapat memberikan kontribusi bagi ilmu pengetahuan dan bermanfaat bagi mereka yang memerlukannya, dan semoga penelitian ini tidak berhenti sampai disini tetapi dapat dilanjutkan untuk tahun selanjutnya.

Samarinda, Oktober 2017

Tim Pelaksana Peneliti

DAFTAR ISI

HAL PENGESAHAN.....	ii
RINGKASAN.....	iii
PRAKATA.....	iv
DAFTAR ISI.....	v
DAFTAR TABEL.....	vi
DAFTAR GAMBAR.....	vii
BAB 1 PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	2
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	3
2.1 Tanaman Sarang Semut (<i>Myrmecodia tuberosa</i> Jack.).....	3
2.2 Kultur Jaringan (<i>In Vitro</i>).....	3
2.3 Metabolit sekunder.....	4
BAB 3 TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN.....	5
3.1. Tujuan.....	5
3.2 Manfaat Penelitian.....	5
BAB 4 METODE PENELITIAN.....	7
4.1. Waktu dan Tempat Penelitian.....	7
4.2. Objek Penelitian.....	7
4.3. Alat dan Bahan.....	7
4.4 Prosedur Kerja.....	7
4.5. Analisa Data Penelitian.....	9
4.6. Indikator Keberhasilan.....	9
4.7. Bagan Alir Rencana Penelitian Selama 2 tahun.....	10
BAB 5 HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI.....	11
5.1. Hasil.....	11
5.1.1. Perkecambahan Biji.....	11
5.1.2. Pembentukan Kalus.....	12
5.1.3. Perlakuan Sukrosa.....	18
5.1.4. Uji Fitokimia.....	21
5.2. Luaran Yang Dicapai.....	23
BAB 6 RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA.....	24
6.1. Alat dan Bahan.....	24
6.2. Prosedur Kerja.....	24
6.3. Analisa Data Penelitian.....	26
6.4. Indikator Keberhasilan.....	26
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN.....	27
DAFTAR PUSTAKA.....	28
LAMPIRAN.....	32

DAFTAR TABEL

	Hal
1. Rencana Target Capaian Tahunan	6
2. Pengaruh Komposisi 2,4-D dan Kinetin Terhadap Pembentukan Kalus Tanaman Sarang Semut (<i>Myrmecodia tuberosa</i> Jack.) pada Eksplan Kotiledon, Batang, Umbi dan Akar pada Umur 10 MST	17
3. Morfologi Kalus dan Rata-rata Pertambahan Berat Basah Kalus Tanaman Sarang Semut (<i>M. tuberosa</i>) pada Perlakuan Konsentrasi Sukrosa yang Bervariasi pada 10 minggu	18
4. Hasil Uji Fitokimia Secara Kualitatif Kalus Tanaman Sarang Semut dengan Konsentrasi Sukrosa yang Berbeda	21

DAFTAR GAMBAR

	Hal
1. Perkecambahan Biji Tanaman Sarang Semut pada Media MS 0; a. Umur 3 Hari, b. Umur 30 Hari	11
2. Perlakuan kalus terbaik pada konsentrasi 2 mg/l 2,4-D + 2 mg/l kinetin pada umur 10 MST pada eksplan ; a = kotiledon;b =batang; c=umbi; d = akar.....	16
3. Kalus tanaman sarang semut dengan perlakuan konsentrasi sukrosa yang bervariasi; a = 30 g/L; b = 60 g/L; c = 90 g/L; d = 120 g/L pada 8 minggu	20

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tumbuhan sarang semut (*Myrmecodia tuberosa* Jack) merupakan tumbuhan asli Indonesia yang telah lama digunakan oleh penduduk untuk mengobati berbagai penyakit. Berdasarkan hasil penelitian modern didapati bahwa tumbuhan sarang semut mengandung senyawa aktif penting seperti flavonoid, tanin, tokoferol, fenolik dan kaya berbagai mineral yang sangat berguna sebagai antioksidan dan anti kanker (Hendra, 2008). Dalam uji *in vitro*, terbukti bahwa sarang semut ampuh menghambat pertumbuhan sel kanker seperti kanker serviks, kanker paru dan kanker usus (Manoi, 2008; Subroto dan Saputro, 2008), sel kanker servik dan payudara (HeLa dan MCM-B2 cells) (Soeksmanto dkk., 2010), sel kanker mulut (sel B88) (Supriatno, 2014) dan juga berfungsi sebagai anti oksidan dan anti mikroba (Prachayasittikul dkk., 2008).

Popularitas tumbuhan sarang semut yang melambung karena khasiatnya sebagai tanaman obat mengakibatkan banyak orang yang memburu tumbuhan sarang semut di alam, sehingga kontinuitas keberadaan tumbuhan tersebut di alam menjadi terancam. Oleh sebab itu perlu dilakukan usaha pelestarian melalui mekanisme pemuliaan dan pembudidayaan.

Salah satu metode budidaya yang dapat digunakan adalah teknik kultur jaringan (*in vitro*). Teknik kultur jaringan dapat menghasilkan tanaman dalam jumlah yang banyak dan dalam waktu yang relatif singkat (Bhatia and Dahiya, 2015; George and Sherrington, 1984). Beberapa faktor yang mempengaruhi keberhasilan kultur jaringan adalah media tanam, zat pengatur tumbuh (zpt), sumber eksplan yang digunakan dan faktor lingkungan. Jenis dan variasi konsentrasi zat pengatur tumbuh yang ditambahkan ke dalam media sangat menentukan keberhasilan teknik kultur jaringan (Shi, 2014).

Selain untuk budidaya tanaman, kultur jaringan juga digunakan untuk memproduksi metabolit sekunder tanaman. Kultur jaringan mempunyai manfaat besar di bidang farmasi karena dapat membantu ketersediaan bahan untuk produksi senyawa obat (Radha dkk., 2011). Pada umumnya untuk mempelajari sintesis metabolit sekunder secara kultur jaringan yang sering digunakan adalah kultur organ, kultur suspensi sel dan kultur kalus (George and Sherrington, 1984). Pengembangbiakan massal melalui kultur jaringan tak mempengaruhi kandungan senyawa aktif sebuah tanaman.

Tanaman sarang semut merupakan tanaman epifit yang hidup bersimbiosa dengan semut. Pada bagian dalam umbi terdapat domatia atau labirin yang dihuni oleh ratusan

semut. Bagian umbi inilah yang sering digunakan sebagai obat (Huxley, 1978); (Soeksmanto dkk., 2010). Jika tanaman sarang semut akan dibiakkan secara kultur jaringan maka perlu kajian yang mendalam tentang kandungan metabolit sekunder yang dihasilkan. Oleh sebab itu dilakukan penelitian ini untuk mengetahui kandungan metabolit sekunder yang dihasilkan oleh kalus tanaman sarang semut yang dihasilkan secara *in vitro*, pengaruh prekursor yang ditambahkan (sukrosa) dalam meningkatkan kandungan metabolitnya serta mengetahui senyawa metabolit sekunder yang dimiliki oleh kalus sarang semut yang berpotensi sebagai antioksidan dan antimikroba.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian di atas beberapa masalah yang akan dijawab dengan penelitian ini adalah 1) apakah tanaman sarang semut dapat menghasilkan kalus secara *in vitro* dengan menggunakan sumber eksplan dan zat pengatur tumbuh yang berbeda? 2) apakah pemberian sukrosa mempengaruhi kandungan metabolit sekunder yang dihasilkan kalus tanaman sarang semut?

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Sarang Semut (*Myrmecodia tuberosa* Jack.)

Sarang semut merupakan tanaman dari suku Hydnophytinae (Rubiaceae) yang berasosiasi dengan semut. Tanaman ini bersifat epifit, artinya menempel pada tanaman lain, tidak hidup secara parasit pada inangnya tetapi hanya memanfaatkannya untuk menempel. Tanaman sarang semut terdiri dari 5 genus yaitu *Hydnophytum*, *Myrmecodia*, *Anthorrhiza* (di daratan Papua Nugini), *Myrmephytum* (di daratan Papua Nugini dan Filipina) dan *Squamellaria* (merupakan tanaman lokal di Pulau Fiji), namun yang paling dekat berasosiasi dengan semut hanya genus *Hydnophytum* dan *Myrmecodia*. Genus *Hydnophytum* terdiri dari 45 spesies sedangkan *Myrmecodia* memiliki 26 spesies. Semua spesies dari kedua genus ini memiliki batang yang menggelembung dan berongga-rongga. Namun dari sekian banyak spesies dari kedua genus tersebut, hanya jenis *H. formicarum*, *M. tuberosa*, *M. pendens* yang digunakan sebagai obat (Subroto dan Saputro, 2008; Soeksmanto dkk., 2010).

Dalam uji *in vitro*, terbukti bahwa sarang semut ampuh menghambat pertumbuhan sel kanker. Peneliti Gui Kim Tran, Yasuhiro Tezuka, Yuko Harimaya, dan Arjun menyatakan bahwa ekstrak sarang semut bersifat antiproliferasi terhadap 3 jenis kanker yaitu kanker serviks, kanker paru dan kanker usus (Manoi, 2008; Subroto dan Saputro, 2008). Ekstrak tanaman sarang semut (*M. pendens*) dapat menghalangi pertumbuhan sel kanker servik dan payudara (HeLa dan MCM-B2 cells) (Soeksmanto dkk., 2010). Ahmad dkk. (2010) menyatakan bahwa jenis *Hydnophytum formicarum* mempunyai total fenolik dan *antioxidant activity* (AOA) yang tinggi. Prachayasittikul dkk. (2008) juga menjelaskan bahwa *H. formicarum* dapat berfungsi sebagai antioksidan dan antimikroba.

2.2 Kultur Jaringan (*In Vitro*)

Teknik kultur jaringan tanaman sangat potensial untuk program pemuliaan tanaman. Dibandingkan dengan perbanyakan tanaman secara konvensional, perbanyakan tanaman secara kultur jaringan mempunyai kelebihan yaitu dapat memperbanyak tanaman tertentu yang sulit atau sangat lambat diperbanyak secara konvensional, ditumbuhkan dalam waktu relatif singkat sehingga lebih ekonomis (Yusnita, 2003). Kultur jaringan tanaman yang sering digunakan dalam produksi metabolit sekunder adalah kultur kalus dan kultur suspensi sel. Kultur kalus dan kultur sel tanaman secara *in vitro* adalah sumber yang potensial untuk produksi metabolit sekunder.

Kultur kalus adalah membiakkan sekelompok sel yang berasal dari jaringan tanaman yang tumbuh dalam medium hara. Medium tersebut terbuat dari garam anorganik, sumber karbon (biasanya sukrosa), auksin dan sitokinin. Komposisi medium merupakan hal yang penting bagi masing-masing spesies yang dibiakkan. Untuk menghasilkan kalus yang baik, zat hara berperan merangsang pertumbuhan sel dengan cepat. Beberapa jaringan tanaman dapat digunakan untuk membentuk biakan kalus seperti akar, batang, daun, meristem dan anther. Namun demikian, untuk spesies-spesies tertentu dari salah satu jenis kalusnya dapat menghasilkan kalus yang lebih baik dari yang lainnya (Suryowinoto, 1996).

2.3 Metabolit Sekunder

Analisis kimia dari tanaman sarang semut menunjukkan bahwa tanaman ini mengandung senyawa-senyawa kimia dari golongan flavonoid dan tanin. Flavonoid merupakan golongan senyawa bahan alam dari senyawa fenolik yang banyak merupakan pigmen tanaman. Fungsi kebanyakan flavonoid dalam tubuh manusia adalah sebagai antioksidan, sehingga sangat baik untuk pencegahan kanker. Penelitian-penelitian mutakhir telah mengungkapkan fungsi lain dari flavonoid, tidak saja untuk pencegahan, tetapi juga untuk pengobatan kanker. Mekanisme kerja flavonoid lainnya adalah inaktivasi karsinogen, antiproliferasi, penghambatan siklus sel, induksi apoptosis, diferensiasi, inhibisi angiogenesis serta pembalikan resistensi multi obat ataupun kombinasi dari mekanisme-mekanisme tersebut. Tanaman sarang semut juga mengandung tokoferol. Tokoferol berfungsi sebagai anti oksidan dan anti kanker. Ia menangkal serangan radikal bebas dengan cara anti degeneratif. Senyawa kaya vitamin E ini mempunyai manfaat sebagai anti penuaan. Bila manusia mengkonsumsi banyak lemak dan radikal bebas, dengan adanya tokoferol akan bisa diatasi karena peran vitamin E bagi kesehatan amat vital. Vitamin E mencegah asam lemak tak jenuh, komponen sel membran dari oksidasi oleh radikal bebas (Manoi, 2008).

BAB 3. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1. Tujuan

Penelitian ini bertujuan jangka pendek adalah untuk 1. mengetahui kombinasi ZPT (2,4-D 0.5, 1, 1.5, 2 mg/L dan kinetin 2 mg/L) dan sumber eksplan (kotiledon, batang, umbi dan akar) terbaik untuk menghasilkan kalus terbaik pada tanaman sarang semut (*M. tuberosa* Jack.) secara *in vitro*, 2. mengetahui pemberian sukrosa terbaik (30, 60, 90, 120 gram) untuk meningkatkan kandungan metabolit sekunder kalus dan 3. uji fitokimia untuk mengetahui kandungan metabolit sekunder yang dimiliki oleh kalus yang dihasilkan

Jangka panjang, ekstrak kalus tanaman sarang semut terbaik yang mempunyai nilai aktivitas antioksidan yang tinggi dapat digunakan untuk menghambat pertumbuhan sel kanker. Seperti diketahui bahwa kanker merupakan salah satu penyebab kematian tertinggi di dunia. Penggunaan kalus tanaman sarang semut dapat dijadikan alternatif pengganti bahan baku obat yang selama ini selalu didapat dari alam. Selain untuk menjaga keberlangsungan hidup tanaman potensial di alam agar tidak punah, dengan menggunakan kalus dan penambahan prekursor tertentu ke dalam media dapat meningkatkan kandungan metabolit sekunder dibandingkan tanaman asli di alam.

3.2. Manfaat Penelitian

Pemanfaatan tanaman obat dalam mengobati berbagai penyakit dewasa ini semakin meningkat. Banyak sekali hasil penelitian yang menunjukkan bahwa bagian tertentu tanaman, potensial untuk digunakan sebagai bahan baku obat. Penggunaan ekstrak umbi tanaman sarang semut dalam menghambat pertumbuhan beberapa jenis kanker sudah dilakukan (Soeksmanto dkk., 2010);(Supriatno, 2014). Akan tetapi pemanfaatan bagian tanaman tanpa adanya upaya budidaya bisa berdampak negatif terhadap keberadaan tanaman tersebut jika dilakukan dalam jangka waktu yang lama. Oleh sebab itu alternatif penggunaan bahan baku selain mengambil dari alam bisa dikembangkan. Penggunaan kalus tanaman yang diperoleh menggunakan teknik kultur jaringan merupakan salah satu solusi yang dapat digunakan. Selain sebagai pengganti bahan baku tanaman yang diperoleh langsung dari alam, dengan menggunakan bahan baku kalus, kandungan metabolit sekunder tanaman dapat ditingkatkan bahkan bisa melebihi kandungan yang dimiliki tanaman aslinya. Dengan demikian manfaat dari penelitian ini adalah memberikan kontribusi terhadap ilmu pengetahuan tentang potensi tumbuhan sarang semut sebagai tumbuhan obat secara *in vitro* dan penyelamatan plasma nutfah asli Kalimantan dari kepunahan.

Tabel 1 Rencana Target Capaian Tahunan

No	Jenis Luaran		Indikator Capaian	
			TS + 1	TS + 2
1	Publikasi ilmiah	Internasional	Draft/submitte d	Reviewed/publishe d
		Nasional terakreditasi	Draft/submitte d	Accepted
2	Pemakalah dalam temu ilmiah	Internasional	Terdaftar	Sudah dilaksanakan
		Nasional terakreditasi	Terdaftar	Sudah dilaksanakan
3	Invited speaker dalam temu ilmiah	Internasional	Tidak ada	Tidak ada
		Nasional terakreditasi	Tidak ada	Tidak ada
4	Visiting Lecturer	Internasional	Tidak ada	Tidak ada
5	Hak Kekayaan Intelektual (HKI)	Paten	Tidak ada	Tidak ada
		Paten sederhana	Tidak ada	Tidak ada
		Hak Cipta	Tidak ada	Tidak ada
		Merek dagang	Tidak ada	Tidak ada
		Rahasia dagang	Tidak ada	Tidak ada
		Desain produk industry	Tidak ada	Tidak ada
		Indikasi geografis	Tidak ada	Tidak ada
No	Jenis Luaran		Indikator Capaian	
			TS + 1	TS + 2
		Perlindungan varietas tanaman	Tidak ada	Tidak ada
		Perlindungan topografi sirkuit terpadu	Tidak ada	Tidak ada
6	Teknologi Tepat Guna		Penerapan	Penerapan
7	Model/Purwarupa/Desain/Karya seni/Rekayasa Sosial		Tidak ada	Tidak ada
8	Buku Ajar		Draft	Published
9	Tingkat Kesiapan Teknologi		3	4

BAB 4. METODE PENELITIAN

4.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dari bulan April-Oktober 2017 di 3 tempat yaitu di Laboratorium Kultur Jaringan, FMIPA dan di Laboratorium Biokimia, FMIPA, Universitas Mulawarman, Samarinda.

4.2. Objek penelitian

Objek yang digunakan dalam penelitian ini adalah biji tumbuhan sarang semut (*Myrmecodia tuberosa*) yang berasal dari Kabupaten Bulungan, Kalimantan Utara.

4.3. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan adalah: *Laminar air flow cabinet* merk ESCO, *autoclave* merk Tomy SX-700, *incubator*, pH meter, *hot plate*, botol kultur, cawan petri, *beaker glass*, gelas ukur, labu ukur, spatula, *erlenmeyer*, plastik (*cling wrap*), lampu spiritus, pinset, skapel, *freeze drying* (Christ Alpha 1-2 LD), *rotary evaporator* (Buchi The RII), corong pisah, timbangan analitik, mikropipet.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah: biji tanaman sarang semut (*M. tuberosa*), media MS (Murashige dan Skoog), agar, sukrosa, zat pengatur tumbuh kinetin, 2,4-Dikloro fenoksiasetat (2,4-D), kinetin, alkohol 95%, bayclin, fungisida Dithane M-45 dan bakterisida Agrept 20-WP, detergent, betadin, NaOH 0,1 N, HCl 0,1 N, akuades, H₂SO₄ 2 M, HCl pekat, pereaksi *Lieberman-Burchard* (CH₃COOH glasial:H₂SO₄pekat), FeCl₃ 1%, pereaksi *dragendroff*(campuran Bi(NO₃)₂.5H₂O dalam asam nitrat dan KI), serbuk Mg.

4.4. Prosedur Kerja

4.4.1. Program Tahun Pertama

Program tahun pertama meliputi: 1) Penanaman biji sarang semut untuk menghasilkan tanaman secara in vitro. 2). Menggunakan sumber eksplan yang berbeda (kotiledon, umbi, batang dan akar) untuk menghasilkan kalus. 3). Penambahan sukrosa sebagai prekursor dengan variasi konsentrasi untuk meningkatkan kandungan metabolit sekunder yang terdapat pada kalus. 3). Uji fitokimia kalus yang dihasilkan secara kualitatif untuk mengetahui kalus terbaik dalam menghasilkan kandungan metabolit sekunder.

A. Persiapan alat dan media

1. Sterilisasi alat

Alat-alat gelas dan *dissecting set* disterilkan dengan menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 30 menit.

2. Pembuatan media MS0 (tanpa penambahan zat pengatur tumbuh)

Pembuatan media MS0 dilakukan menurut Yusnita (2003).

3. Pembuatan Media Pembentukan Kalus

Cara kerjanya hampir sama dengan pembuatan media MS0, tetapi untuk pembuatan media kalus ditambahkan kombinasi zat pengatur tumbuh 2 mg/L Kinetin dan 0.5, 1, 1.5, 2 mg/L 2, 4 D.

B. Penanaman Eksplan

1. Sterilisasi biji

Biji tanaman sarang semut dicuci dengan detergen, direndam dalam larutan fungisida dan bakterisida selama 30 menit, di cuci dengan air mengalir selama 30 menit. Kemudian sterilisasi dilakukan di dalam *laminar flow cabinet*, biji dimasukkan dalam larutan alkohol 70% kira-kira 1 menit, aquadest steril selama 5 menit, larutan bayclin 30% selama 10 menit, bayclin 20% selama 10 menit, bayclin 10% selama 10 menit, dan direndam dengan aquadest sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit (Sari dan Kusuma, 2015)

2. Penanaman biji

Biji yang telah steril selanjutnya ditanam dalam media perkecambahan (MS0) dan diinkubasi dalam ruang kultur dengan intensitas cahaya $\pm 1000-2000$ lux. Tanaman yang telah berumur ± 1 bulan digunakan sebagai sumber eksplan untuk pembentukan kalus. Sumber eksplan yang digunakan adalah kotiledon, umbi, batang dan akar.

3. Pembentukan kalus

Eksplan ditanam pada media perlakuan dan diinkubasi dalam ruang kultur dengan intensitas cahaya $\pm 1000-2000$ lux dan suhu 20-25°C selama 10 minggu. Kalus dari eksplan terbaik akan digunakan pada perlakuan sukrosa.

C. Perlakuan Sukrosa

Kalus seberat 0,5 gram ditimbang dan dimasukkan ke dalam media MS yang telah ditambahkan sukrosa dengan konsentrasi yang berbeda (30, 60, 90 dan 120 gram). Setelah 3 bulan pengamatan, kalus pada masing-masing perlakuan diuji kandungan fitokimianya (secara kualitatif). Kalus yang mengandung metabolit sekunder terbanyak akan digunakan untuk uji selanjutnya (di tahun kedua yaitu ekstraksi, fraksinasi, uji total fenolik, uji total flavonoid, uji antioksidan, uji anti mikroba dengan menggunakan bakteri *Staphylococcus aureus* dan bakteri *Salmonella typhi* dan uji toksisitas menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT).

D. Uji fitokimia Kalus Tanaman Sarang Semut.

1. Ekstraksi senyawa metabolit sekunder

Kalus diekstraksi dengan cara menggerus kalus dengan etanol dalam lumpang kaca. Ekstraksi dilakukan sampai larutan ekstrak tidak berwarna lagi, dilanjutkan dengan penyaringan. Setelah disaring, pelarut diuapkan dengan rotari evaporator sehingga diperoleh ekstrak etanol, dilanjutkan dengan uji fitokimia agar diketahui senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak kalus tanaman sarang semut.

2. Uji fitokimia (kualitatif)

Uji Alkaloid (Dragendorff-Meyer), dilakukan menurut Robinson (1995), uji flavonoid, fenolik, saponin dan steroid/triterpenoid menurut Harborne (1987).

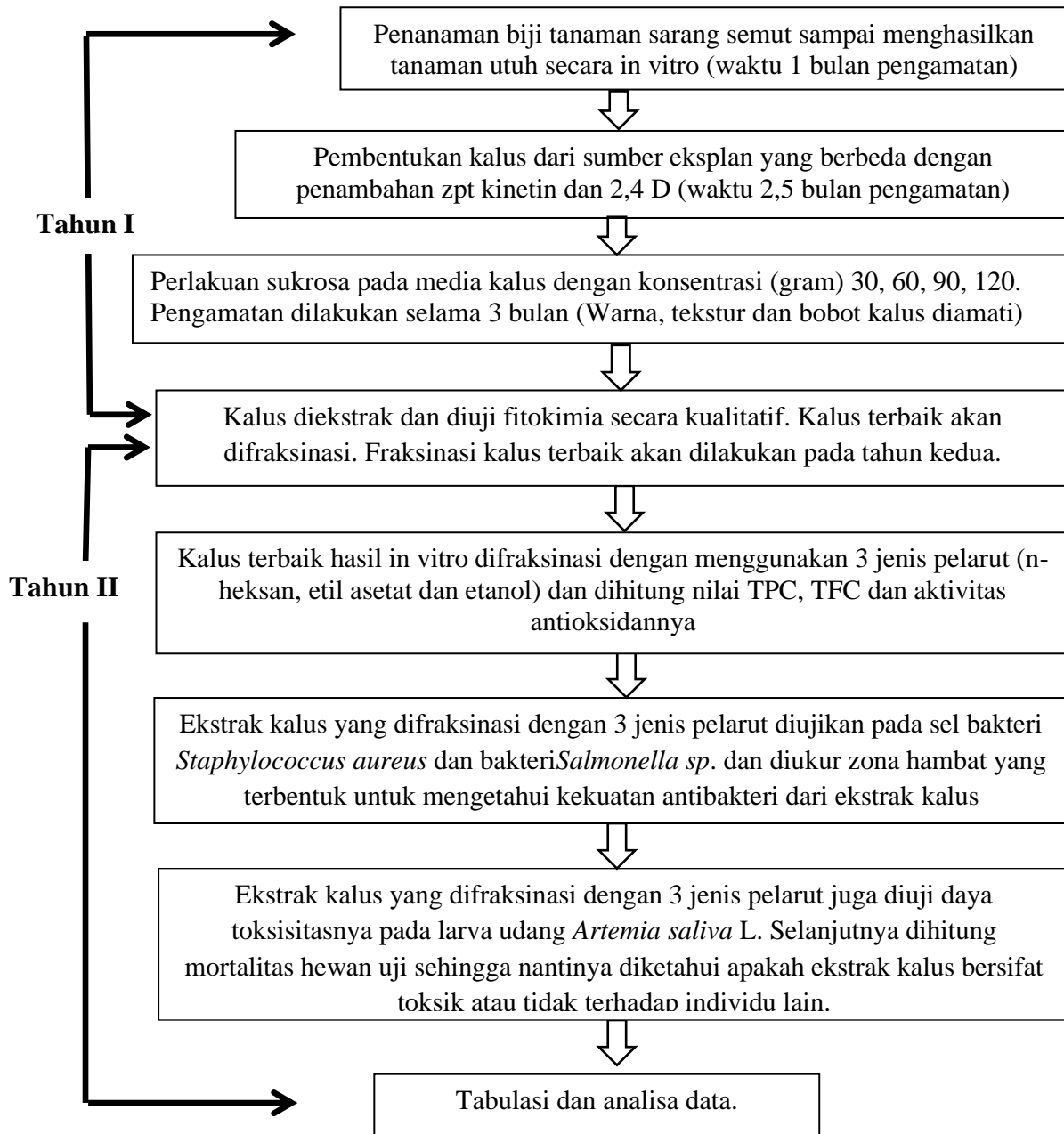
4.5. Analisa Data Penelitian

Data kualitatif yang diperoleh disajikan secara deskriptif, sedangkan data kuantitatif disajikan dalam mean \pm SE (Standard Error). Mean data hasil pengamatan pada kalus dianalisis menggunakan uji analisis varian (Anava) satu arah, untuk mengetahui adanya beda nyata. Jika ada beda nyata, maka uji dilanjutkan dengan menggunakan uji *Tukey* pada taraf $\alpha = 5\%$. Baik Uji ANAVA maupun *Tukey* dilakukan dengan menggunakan program perangkat lunak SPSS versi 20 (SPSS, Inc., USA).

4.6. Indikator Keberhasilan

Indikator keberhasilan meliputi: 1) Diperolehnya kalus terbaik tanaman sarang semut dari beberapa sumber eksplan yang digunakan. 2) Diperolehnya konsentrasi optimum sukrosa yang ditambahkan ke dalam media untuk meningkatkan kandungan metabolit sekunder yang terdapat pada kalus dibuktikan dengan uji Fitokimia, untuk digunakan pada penelitian tahun kedua.

4.7. Bagan Alir Rencana Penelitian Selama 2 Tahun

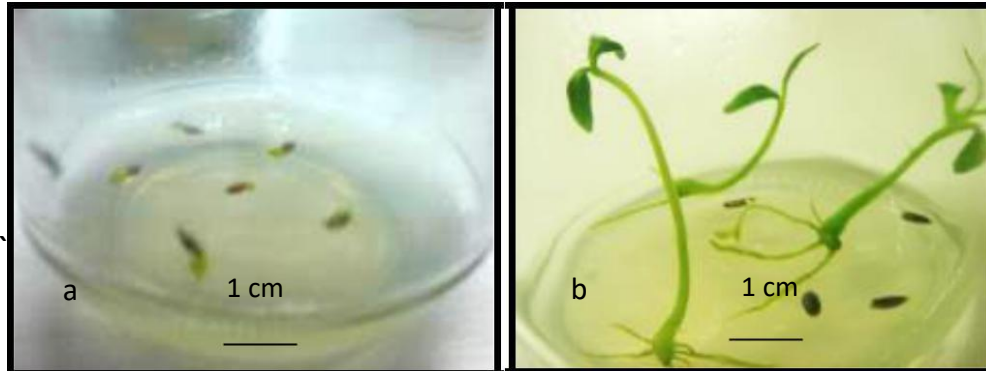


BAB 5. HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI

5.1. Hasil

5.1.1 Perkecambahan Biji

Biji tanaman sarang semut yang ditanam dalam MS 0 (tanpa penambahan zat pengatur tumbuh) rata-rata mulai berkecambah pada hari ke 3 setelah tanam dan menjadi tanaman utuh pada hari ke 30 (Gambar 1).



Gambar 1. Perkecambahan Biji Tanaman Sarang Semut pada Media MS 0; a. Umur 3 Hari, b. Umur 30 Hari.

Perkecambahan biji tanaman sarang semut secara kultur jaringan dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu faktor dalam dan faktor luar. Faktor dalam dapat berasal dari cadangan makanan (endosperm) dan tingkat kemasakan pada benih. Menurut Salisbury dan Ross (1995), bagian biji yang bersifat embrionik dan banyak mengandung cadangan makanan akan menghasilkan giberelin yang akan merangsang sel-sel pada lapisan luar endosperm untuk mensintesis dan mensekresi α -amilase serta enzim hidrolase lainnya. Enzim-enzim tersebut berfungsi mendegradasi pati, protein dan cadangan makanan lain pada endospermguna menghasilkan nutrisi untuk perkembangan kecambah. Apabila senyawa-senyawa organik cukup, maka kecambah normal akan terbentuk yang dilanjutkan dengan pembentukan tunas.

Perkecambahan biji juga dipengaruhi oleh faktor luar seperti medium, air, temperatur, oksigen dan cahaya. Menurut Sutopo (2002), air merupakan salah satu syarat penting bagi berlangsungnya proses perkecambahan benih. Air yang diserap oleh biji berfungsi untuk melunakkan kulit benih dan menyebabkan pengembangan pada embrio dan endosperm. Gardner (1991) menyatakan bahwa pada saat perkecambahan berlangsung proses respirasi meningkat disertai dengan peningkatan pengambilan oksigen dan

pelepasan karbon dioksida, air dan energi yang berupa panas. Kebutuhan benih akan cahaya untuk perkecambahannya bervariasi tergantung pada jenis tanaman.

Selain faktor di atas keberhasilan perkecambahan benih sarang semut dalam waktu singkat juga dipengaruhi oleh komposisi media MS 0. Komposisi media MS yang mengandung beberapa asam amino diduga juga menyebabkan benih cepat berkecambah. Waes dan Debergh (1986) menyatakan bahwa penambahan asam amino serin, asam glutamat, pepton, casein hidrolisat dan yeast ekstrak ke dalam media akan merangsang perkecambahan pada benih.

Tanaman sarang semut yang telah berumur 30 hari, selanjutnya digunakan sebagai sumber eksplan untuk ditanam pada media perlakuan inisiasi. Sumber eksplan yang digunakan adalah kotiledon, hipokotil, umbi dan akar.

5.1.2. Pembentukan Kalus

Berdasarkan hasil pengamatan yang telah dilakukan selama 10 MST (minggu setelah tanam) diketahui bahwa komposisi 2,4-D dan kinetin berpengaruh pada pembentukan kalus pada eksplan kotiledon, batang, umbi dan akar dari tanaman sarang semut (Tabel 2).

Tabel 2. Pengaruh Komposisi 2,4-D dan Kinetin Terhadap Pembentukan Kalus Tanaman Sarang Semut (*Myrmecodia tuberosa* Jack.) pada Eksplan Kotiledon, Batang, Umbi dan Akar pada Umur 10 MST.

Eksplan	Zat Pengatur Tumbuh		Persentase kalus yang muncul (%)	Waktu munculnya kalus (minggu)	Morfologi Kalus		Intensitas Kalus
	2,4-D mg/L	Kinetin mg/L			Warna	Tekstur	
Kotiledon	0,5	0,0	100	2	Kuning	Remah	++
	1,0	0,0	100	2	Kuning	Remah	++
	1,5	0,0	100	2	Hijau-kekuningan	Remah	++
	2,0	0,0	100	2	Hijau-kekuningan	Remah	++
	0,5	2,0	100	2	Hijau-kekuningan	Remah	+++
	1,0	2,0	100	2	Hijau-kekuningan	Remah	+++
	1,5	2,0	100	2	Hijau-kekuningan	Remah	+++
	2,0	2,0	100	2	Hijau-Hijau-kekuningan	Remah	+++
Batang	0,5	0,0	100	2	Hijau-kekuningan	Remah	++

Eksplan	Zat Pengatur Tumbuh		Persentase kalus yang muncul (%)	Waktu munculnya kalus (minggu)	Morfologi Kalus		Intensitas Kalus
	2,4-D mg/L	Kinetin mg/L			Warna	Tekstur	
	1,0	0,0	100	2	Kuning	Remah	++
	1,5	0,0	100	2	Hijau-kekuningan	Remah	++
	2,0	0,0	100	2	Kuning	Remah	++
	0,5	2,0	100	2	Kuning	Remah	+++
	1,0	2,0	100	2	Hijau-kekuningan	Remah	+++
	1,5	2,0	100	2	Hijau-kekuningan	Remah	+++
	2,0	2,0	100	2	Hijau-kekuningan	Remah	+++
	Umbi	0,5	0,0	100	2	Hijau muda	Remah
1,0		0,0	100	2	Hijau-kekuningan	Remah	++
1,5		0,0	100	2	Hijau-kekuningan	Remah	++
2,0		0,0	100	2	Kuning	Remah	++
0,5		2,0	100	2	Hijau-kekuningan	Remah	+++
1,0		2,0	100	2	Kuning	Remah	+++
1,5		2,0	100	2	Kuning	Remah	+++
2,0		2,0	100	2	Hijau muda	Remah	+++
Akar	0,5	0,0	100	2	Hijau muda	Remah	+
	1,0	0,0	100	2	Hijau muda	Remah	+
	1,5	0,0	100	2	Hijau-kekuningan	Remah	++
	2,0	0,0	100	2	Hijau-kekuningan	Remah	++
	0,5	2,0	100	2	Hijau-kekuningan	Remah	+++
	1,0	2,0	100	2	Hijau-kekuningan	Remah	+++
	1,5	2,0	100	2	Hijau-kekuningan	Remah	+++
	2,0	2,0	100	2	Hijau-kekuningan	Remah	+++

Ket : + = sedikit, ++ = sedang, +++ = banyak.

Kalus yang diperoleh pada semua perlakuan kombinasi zpt yang diberikan menghasilkan persentase kalus 100%. Kalus adalah massa sel yang belum terdiferensiasi. Pembentukan kalus melalui pertumbuhan dan akumulasi sel erat kaitannya dengan pelukaan pada tanaman. Selanjutnya sel-sel yang bersifat meristematik akan tumbuh di seluruh bagian tanaman (Nagata dan Takebe, 1971). Kalus mulai terbentuk pada umur 2 minggu, yang ditandai dengan membengkaknya eksplan dan mulai terbentuk kalus pada bagian tepi eksplan atau bagian irisan atau pelukaan. Kalus terlihat lebih cepat terbentuk pada bagian yang bersentuhan dengan media. Hal ini kemungkinan berkaitan dengan proses pengambilan nutrisi medium oleh eksplan. Penyerapan unsur hara akan lebih baik jika terjadi kontak langsung antara media dengan bagian bawah eksplan.

Hasil ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Morini dkk (2000), yang mengungkapkan bahwa pembentukan kalus pada daun quince hanya terbentuk pada permukaan abaksial. Munculnya kalus pada bagian yang terluka diduga karena adanya rangsangan dari jaringan pada eksplan untuk menutupi lukanya.

Pemberian zat pengatur tumbuh pada media MS dari golongan auksin (2,4-D) dan sitokinin (kinetin), mampu menginduksi terbentuknya kalus baik pada perlakuan tunggal maupun kombinasi. Kalus mulai terlihat pada bagian tepi eksplan dan juga pada bagian-bagian yang dilukai dan terus membesar hingga akhir pengamatan pada 10 MST. Selain itu, Stobbe dkk (2002) menyatakan bahwa luka akan membentuk kalus dan organ baru atau jaringan baru. Hal ini menunjukkan sel tersebut merupakan sel yang sangat pluripoten.

Pada perlakuan 2,4-D tanpa kinetin, menghasilkan respon pertumbuhan kalus pada semua eksplan (kotiledon, batang, umbi dan akar), akan tetapi kalus yang dihasilkan berukuran lebih kecil dan dibutuhkan waktu cenderung lama untuk bertambah besar. Hal ini menunjukkan bahwa kalus tanaman sarang semut tidak dapat tumbuh optimal dengan pemberian auksin tunggal tanpa penambahan ZPT dari golongan sitokinin. Menurut Kala dkk (2014) zat pengatur tumbuh tunggal tidak dapat merangsang terbentuknya kalus dari eksplan daun *C. Parviflorum*. Namun, kombinasi dari zat pengatur tumbuh menghasilkan kalus yang optimum. Pembentukan kalus sangat dipengaruhi oleh jenis dan konsentrasi dari zat pengatur tumbuh. Menurut Zulfiqar dkk., (2009) pertumbuhan dan morfogenesis tanaman secara *in vitro* dikendalikan oleh keseimbangan dan interaksi antara ZPT yang diserap dari media. Auksin berperan dalam merangsang pertumbuhan sel-sel eksplan, sehingga auksin akan cenderung membentuk kalus yang berawal dari pembelahan sel pada daerah meristematik. Pada awal respon pertumbuhan, auksin akan memicu pemanjangan

sel melalui pelonggaran selulosa dinding sel. Pemanjangan sel ini sebagai respon dari 2,4-D, namun sel tersebut tidak dapat membelah dengan cepat karena tidak ada penambahan kinetin. Perlakuan kombinasi 2,4-D dan kinetin, pada semua sumber eksplan (kotiledon, batang, umbi dan akar), menghasilkan kalus yang lebih besar ukurannya dibanding pemberian ZPT 2,4-D tunggal. Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya (Rout dkk, 2000) bahwa, kombinasi dari 2,4-D dan kinetin menghasilkan kalus terbesar dari *Cephaelis ipecacuanha* dan pada *Melaleuca alternifolia* (Kiong dkk, 2007). Stella dan Braga (2002) menyatakan kalus dari *Rudgea jasminoides* terbentuk pada kombinasi dari auksin (pikloram) dan sitokinin (kinetin).

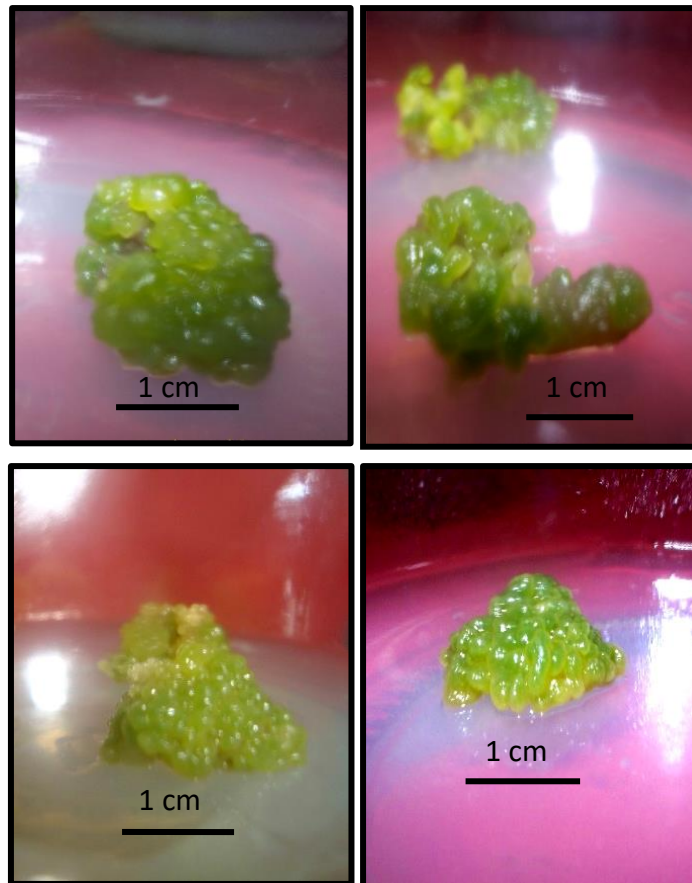
Kalus terbaik ditemukan pada penambahan 2 mg/L 2,4-D dan 2 mg/L kinetin pada semua eksplan yang digunakan. Selain ukuran kalus yang lebih besar, juga dihasilkan warna kalus yang lebih hijau dan tekstur yang remah. Besarnya ukuran kalus yang terbentuk berhubungan dengan konsentrasi zpt yang diberikan. Kalus dapat terbentuk dari pemberian dua zat pengatur tumbuh yaitu hormon auksin dan sitokinin dengan konsentrasi yang seimbang.

Warna Kalus

Dari hasil pengamatan selama 10 MST, kombinasi zat pengatur tumbuh 2,4-D dan kinetin pada media MS mampu menginduksi terbentuknya kalus pada berbagai eksplan dari tanaman sarang semut (Gambar 2). Warna kalus yang dihasilkan pada semua perlakuan berkisar antara warna kuning, hijau muda dan hijau kekuningan. Variasi warna yang dihasilkan mungkin disebabkan karena adanya perbedaan jenis ZPT, perbedaan konsentrasi ZPT yang diberikan serta jenis eksplan yang digunakan. Jika dibandingkan dengan pemberian auksin tunggal, kombinasi auksin dan sitokinin dapat menghasilkan warna kalus yang lebih hijau. Hal ini disebabkan karena sitokinin dapat merangsang pembentukan klorofil (George dkk, 2008). Menurut Afshari dkk (2011) warna kalus yang beragam dapat dipengaruhi oleh pigmentasi, intensitas cahaya dan bagian tanaman yang digunakan sebagai sumber eksplan.

Berdasarkan warna kalus (Gambar 2), kalus berwarna hijau muda sampai hijau kekuningan terdapat pada perlakuan 2 mg/l 2,4-D + 2 mg/l kinetin. Warna hijau-kekuningan pada kalus tanaman sarang semut mungkin disebabkan karena kalus sudah mengandung klorofil. Klorofil yang terbentuk pada kalus disebabkan karena adanya penambahan ZPT 2,4-D dan kinetin, terutama kinetin dari kelompok sitokinin yang

berperan dalam pembentukan klorofil pada kalus serta faktor lingkungan yaitu cahaya. Hal ini sesuai dengan pendapat Leupin dkk (2000) bahwa perubahan warna kalus menjadi kehijauan, kemungkinan pada sel kalus sudah mulai terbentuk klorofil. Salisbury dan Ross (1995), menyatakan bahwa penambahan sitokinin akan memacu dan meningkatkan perkembangan kloroplas dan klorofil.



Gambar 2. Perlakuan kalus terbaik pada konsentrasi 2 mg/l 2,4-D + 2 mg/l kinetin pada umur 1 MST pada eksplan ; a = kotiledon; b = batang; c = umbi; d = akar.

Keterangan : warna kalus :  = (hijau-kekuningan),  = (hijau muda),  = kuning

Berdasarkan warna kalus (Gambar 2), kalus berwarna hijau muda sampai hijau kekuningan terdapat pada perlakuan 2 mg/l 2,4-D + 2 mg/l kinetin. Warna hijau-kekuningan pada kalus tanaman sarang semut mungkin disebabkan karena kalus sudah mengandung klorofil. Klorofil yang terbentuk pada kalus disebabkan karena adanya penambahan ZPT 2,4-D dan kinetin, terutama kinetin dari kelompok sitokinin yang berperan dalam pembentukan klorofil pada kalus serta faktor lingkungan yaitu cahaya. Hal ini sesuai dengan pendapat Leupin dkk (2000) bahwa perubahan warna kalus menjadi kehijauan, kemungkinan pada sel kalus sudah mulai terbentuk klorofil. Salisbury dan Ross

(1995), menyatakan bahwa penambahan sitokinin akan memacu dan meningkatkan perkembangan kloroplas dan klorofil.

Warna kalus kuning sampai kuning kehijauan (Tabel 2) diduga karena konsentrasi kinetin yang terdapat pada media lebih rendah daripada konsentrasi 2,4-D. Kinetin sebagai sitokinin memacu pembentukan klorofil, sebaliknya auksin bisa menjadi penghambat. Menurut George dan Sherrington (1984) akan terjadi penurunan pembentukan klorofil apabila terdapat 2,4-D pada kultur kacang kapri dan kentang. Selain itu warna kuning juga bisa disebabkan karena proses degradasi klorofil karena tidak ada penambahan kinetin dan konsentrasi kinetin yang rendah. Dimana kinetin berperan dalam pembentukan klorofil, sehingga menyebabkan warna hijau tidak muncul. Hal ini sesuai dengan pendapat Santosa dan Nursandi (2002) bahwa kalus yang tidak hijau disebabkan oleh polarisasi, sehingga terjadi proses dekomposisi klorofil.

Tekstur Kalus

Berdasarkan tabel pengamatan (Tabel 2) diketahui bahwa kalus yang dihasilkan pada semua perlakuan bertekstur remah. Kalus remah terjadi melalui proses pertumbuhan yang mengarah pada pembentukan sel-sel yang berukuran kecil dan berikatan longgar. Dalam hal ini auksin memiliki peran terhadap pembentukan kalus remah. Menurut Robbiani dkk., (2010), 2,4-D menstimulasi pemanjangan sel dengan cara penambahan plastisitas dinding sel menjadi longgar, sehingga air dapat masuk ke dalam dinding sel dengan cara osmosis dan sel mengalami pemanjangan. Oleh karena itu, kalus yang remah mengandung banyak air karena belum mengalami lignifikasi dinding sel, antara kumpulan sel yang satu dengan yang lain relatif lebih mudah untuk dipisahkan. Tekstur kalus yang muncul pada eksplan dikelompokkan menjadi 2 yaitu remah (*friable*) dan kompak (*nonfriable*). Kalus yang kompak mempunyai susunan sel yang rapat dan padat sehingga sulit untuk dipisah-pisahkan. Secara visual, kalus remah yang terbentuk pada eksplan mempunyai ikatan antar sel yang tampak renggang, mudah dipisahkan dan jika diambil dengan pinset kalus mudah lepas.

Pada pemberian ZPT dengan kombinasi 2,4-D dan kinetin pada berbagai eksplan terlihat bahwa kalus yang terbentuk memiliki tekstur remah (Gambar 2). Kalus yang remah juga diperoleh pada penelitian yang dilakukan oleh Sari dan Kusuma (2015) yang menyatakan bahwa kalus yang remah juga diperoleh pada kotiledon tanaman sarang semut yang ditanam pada media MS padat dan cair. Hal ini sesuai dengan Chakraborty dkk

(2013) menunjukkan bahwa pembentukan kalus terbaik dari eksplan *Withania somnifera* (L.) ditemukan pada media MS dengan penambahan 2,4-D (0.5 mg/L) dan kinetin (0.2 mg/L) dengan ciri kalus halus, remah, putih kehijauan. Penambahan zat pengatur tumbuh pada media menyebabkan sel-sel kalus aktif dalam pembelahan sel, pembesaran sel, menaikkan tekanan osmotik dan meningkatkan sintesis protein.

Penampakan kalus secara visual menunjukkan bahwa pemberian 2,4-D tunggal dan 2,4-D kombinasi kinetin menghasilkan kalus yang remah dan terbentuk adanya nodul-nodul (globular). Hal ini menunjukkan bahwa kemungkinan kalus yang diperoleh akan tumbuh menjadi tunas atau planlet. Menurut Purnamaningsih (2006), biasanya struktur kalus menggambarkan daya regenerasinya membentuk tunas dan akar. Kalus yang berbentuk remah dan terdapat nodul-nodul berwarna bening biasanya mempunyai kemampuan lebih tinggi untuk membentuk tunas daripada kalus yang bersifat kompak. Dalam hal ini ZPT yang digunakan untuk memacu regenerasi kalus akan sangat menentukan. Keseimbangan nutrisi dalam media tumbuh sangat mempengaruhi pertumbuhan kalus.

5.1.3. Perlakuan Sukrosa

Penambahan sukrosa dengan konsentrasi yang berbeda berpengaruh signifikan terhadap rata-rata pertambahan berat kalus. Hasil pengamatan dapat dilihat pada pada Tabel 3 dibawah ini.

Tabel 3. Morfologi Kalus dan Rata-rata Pertambahan Berat Basah Kalus Tanaman Sarang Semut (*M. tuberosa*) pada Perlakuan Konsentrasi Sukrosa yang Bervariasi pada 10 minggu.

Perlakuan sukrosa (g)	Morfologi Kalus		Rata-rata Pertambahan Berat Basah Kalus (g)
	Warna	Tekstur	
30	Hijau	Remah	2,12 ± 0,40 ^d
60	Hijau-hijau kekuningan	Remah	1,60 ± 0,18 ^c
90	Hijau kekuningan	Remah	1,15 ± 0,28 ^b
120	Hijau kekuningan	Remah	0,68 ± 0,69 ^a

Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji Tukey dengan taraf kepercayaan 95%.

Morfologi Kalus

Kallogenesis merupakan respon awal yang ditandai dengan terbentuknya kalus yang mulai terbentuk pada bagian tepi eksplan (bagian perlukaan) bagian atas maupun bagian bawah yang bersentuhan dengan media. Kalus lebih cepat terbentuk pada bagian yang bersentuhan dengan media. Hal ini kemungkinan berkaitan dengan proses pengambilan nutrisi medium oleh eksplan. Munculnya kalus pada bagian yang terluka diduga karena adanya rangsangan dari jaringan pada eksplan untuk menutupi lukanya. Menurut George and Sherrington (1984), pembelahan sel yang mengarah pada terbentuknya kalus terjadi dari adanya respon terhadap luka dan suplai hormon alamiah atau buatan dari luar ke dalam eksplan.

Faktor pencahayaan juga berperan dalam pembentukan kalus. Perubahan warna yang terjadi pada kalus akibat adanya pigmen dan dipengaruhi oleh nutrisi dan faktor lingkungan seperti cahaya (Evans dkk., 2003). Menurut George and Sherrington (1984), bahwa cahaya putih dapat merangsang pembentukan kalus dan organogenesis dalam kultur jaringan tumbuhan. Kalus yang berwarna hijau kekuningan dan hijau terbentuk pada perlakuan dengan penambahan kinetin. Warna hijau ini disebabkan kalus mengandung klorofil, akibat interaksi 2,4 D dan kinetin, terutama kinetin (sitokinin) yang berperan dalam pembentukan klorofil pada kalus serta faktor lingkungan yaitu paparan cahaya. Leupin dkk. (2000) menyatakan bahwa perubahan warna kalus menjadi putih kehijauan disebabkan karena sel kalus sudah mulai membentuk klorofil.

Pertumbuhan kalus

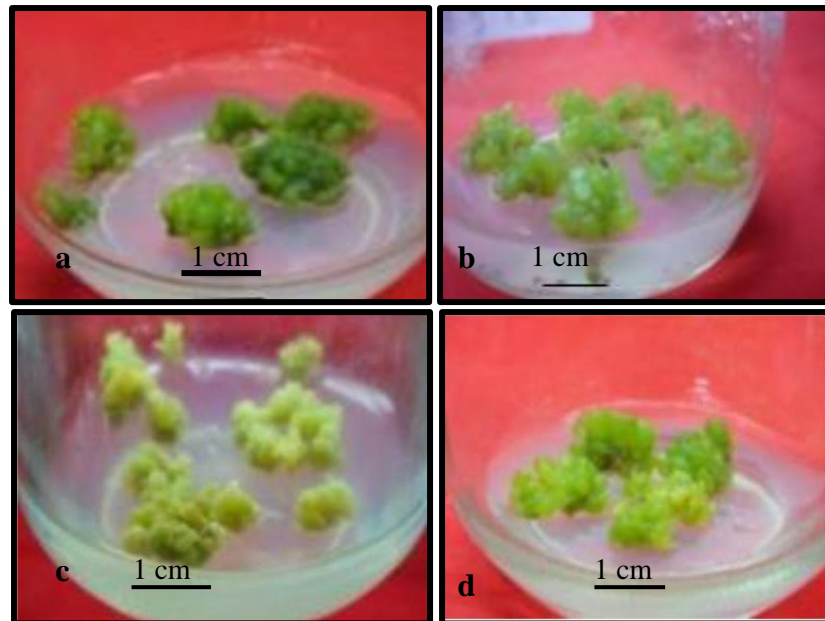
Rata-rata berat kalus terbesar pada tanaman sarang semut didapatkan pada penambahan sukrosa 30 g/L (Tabel 3). Penambahan jumlah sukrosa justru mengakibatkan bobot kalus berkurang. Pada perlakuan 60 g/L sukrosa mengalami penurunan bobot kalus menjadi 1.60 g. Hal ini disebabkan makin bertambah pekatnya konsentrasi media sehingga menghambat penyerapan air dan mineral yang ada. Peristiwa penghambatan tersebut semakin tampak pada perlakuan 90 g/L dan 120 g/L sukrosa yang mana rata-rata bobot kalus 1.15 g dan 0.68 g. Berdasarkan hasil pengamatan ini maka dapat diperkirakan bahwa jumlah sukrosa yang meningkat di atas 30 g/L dapat menghambat pertumbuhan kalus *M. tuberosa*. Lindsey dan Yeoman (1983) menyatakan, bahwa terhambatnya pertumbuhan pada kultur yang menghasilkan metabolit sekunder kemungkinan disebabkan terjadinya kompetisi antara metabolisme primer dengan metabolisme sekunder untuk memperebutkan

zat yang sama. Tanaman *M. tuberosa* merupakan tanaman obat sehingga diyakini bahwa kalusnya yang terbentuk secara kultur jaringan juga memiliki kandungan metabolit sekunder yang sama dengan tanaman aslinya di alam.

Warna kalus yang dihasilkan pada pengamatan berkisar antara hijau dan hijau kekuningan. Warna kalus mengindikasikan keberadaan klorofil dalam jaringan. Kalus yang berwarna hijau terdapat pada perlakuan media MS dengan konsentrasi sukrosa 30 g/L dan 60 g/L. Semakin hijau warna kalus semakin banyak pula kandungan klorofilnya sehingga mampu mendukung pertumbuhan kalus tersebut. Kalus yang berwarna kuning-kehijauan terdapat pada perlakuan konsentrasi sukrosa 90 g/L dan 120 g/L. Variasi warna yang dihasilkan diduga disebabkan karena adanya perbedaan konsentrasi sukrosa pada masing-masing perlakuan. Menurut George dan Sherrington (1984), sukrosa dalam media kultur jaringan dapat menghambat sintesis klorofil dengan tingkat penghambatan yang berbeda-beda tergantung jaringan dan spesies tumbuhan. Penimbunan sukrosa dalam sel dapat menghambat proses fotosintesis disebabkan karena penimbunan sukrosa dalam sel menyebabkan kebutuhan gula dalam sel sudah terpenuhi akibatnya sel-sel tidak melakukan fotosintesis, sehingga pembentukan klorofil terhambat.

Pertumbuhan pada kultur jaringan salah satunya dapat dicirikan dengan bertambahnya berat basah kalus. Secara fisiologis berat basah kalus terdiri dari air dan karbohidrat yang berkaitan dengan sukrosa pada media kultur sebagai sumber karbon dan osmoregulator, yang berperan dalam pembentukan kalus dan embrio (Last dan Breteell, 1990). Sukrosa dalam sel akan terhidrolisis menjadi glukosa dan fruktosa, yang berperan dalam meningkatkan osmolalitas pada media. Dalam hal ini diduga sukrosa yang terdapat pada media perlakuan masuk ke dalam sel tanaman melalui proses difusi dan osmosis. Shahnewaz dan Bari (2004) menyatakan bahwa pemberian konsentrasi sukrosa mempengaruhi frekuensi pembentukan kalus.

Glukosa dan fruktosa dalam proses metabolisme sel akan masuk ke dalam reaksi glikolisis dan siklus krebs untuk membentuk energi berupa ATP yang akan digunakan untuk pertumbuhan kalus. Perry dkk (1987) menyatakan bahwa mengganti komposisi larutan (contoh: sumber karbon) dapat menyebabkan beragam perubahan di turgor dan osmotik turgor. Tekanan turgor mampu menyebabkan pemanjangan dan perbesaran sel kalus. Lebih lanjut, tekanan turgor mungkin berbeda di setiap sel, dan respon pertumbuhan sel dengan penambahan karbohidrat juga beragam untuk setiap spesies.



Gambar 3. Kalus tanaman sarang semut dengan perlakuan konsentrasi sukrosa yang bervariasi; a = 30 g/L; b = 60 g/L; c = 90 g/L; d = 120 g/L pada 8 minggu.

5.1.4. Uji Fitokimia

Uji fitokimia kalus tanaman sarang semut dengan penambahan sukrosa yang berbeda dapat dilihat pada Tabel 4 dibawah ini.

Tabel 4. Hasil Uji Fitokimia Secara Kualitatif Kalus Tanaman Sarang Semut dengan Konsentrasi Sukrosa yang Berbeda

Perlakuan sukrosa (gram)	Flavonoid	Fenolik	Alkaloid	Saponin	Steroid	Triterpenoid
30	+	+	+	+	+	-
60	+	+	+	+	+	-
90	+	+	+	+	+	-
120	+	+	+	+	+	-

Hasil uji fitokimia yang dilakukan pada kalus tanaman sarang semut dengan perlakuan sukrosa yang berbeda konsentrasinya menunjukkan bahwa kandungan metabolit yang dimiliki pada masing-masing perlakuan adalah sama yaitu positif mengandung flavonoid, fenolik, alkaloid, steroid sedangkan untuk uji triterpenoid semuanya negatif. Perlakuan pemberian sukrosa terbaik diperoleh dengan penambahan 30 gram sukrosa. Hasil yang diperoleh pada kalus tanaman sarang semut hasil kultur jaringan sama dengan kandungan metabolit tanaman sarang semut yang terdapat di alam. Sari et al (2017) menyatakan bahwa semua bagian tanaman sarang semut (umbi, batang dan daun) yang berasal dari

alam positif mengandung fenolik, flavonoid, alkaloid, saponin dan steroid. Fowler (1983) mengemukakan bahwa metode kultur jaringan dapat digunakan untuk memproduksi senyawa kimia yang biasa dihasilkan oleh tumbuhan asalnya, selain juga dapat mensintesis senyawa baru dari tanaman yang sulit tumbuh dan sumber penghasil senyawa kimia yang tidak dihasilkan oleh induknya. Kandungan metabolit yang dihasilkan oleh eksplan dari kultur bergantung pula pada kondisi pemeliharaan. Bila sel tersebut dipelihara dalam lingkungan yang sesuai maka akan mampu mensintesis metabolit sekunder seperti yang disintesis oleh tanaman induknya.

Berdasarkan aspek pemanfaatan tanaman sarang semut memiliki berbagai kandungan senyawa kimia. Kandungan senyawa kimia dari tanaman ini diduga memiliki peranan dalam aktivitas resistensi patogen, alelopati dan pertahanan tubuh terhadap serangan hama. Senyawa tersebut dimanfaatkan oleh tanaman sebagai sistem pertahanan diri, sedangkan bagi manusia dimanfaatkan sebagai bahan aktif untuk obat. Menurut Subroto dan Saputro (2008), tumbuhan sarang semut kaya akan antioksidan tokoferol (vitamin E) dan beberapa mineral penting untuk tubuh seperti kalsium.

Koes dkk (2005) menyatakan flavanoid dapat disintesis pada semua bagian dari tanaman peran yang sangat penting untuk memunculkan warna, bau dan rasa pada buah, bunga dan biji yang membuat tanaman menarik bagi serangga, burung ataupun mamalia dan membantu penyebaran polen atau biji. Selain itu, Blount dkk (1992) menyatakan bahwa flavonoid sangat penting bagi tanaman untuk resisten terhadap bakteri patogen dan jamur yang juga memiliki antipatogen yang bisa jadi tidak spesifik dan hasilnya sebagian merupakan penghasil antioksidan. Selain itu, Beckman (2000) menambahkan bahwa flavonoid dapat mempengaruhi kekuatan jaringan untuk aktifitas stimulasi auksin (IAA), yang membantu diferensiasi jaringan dan pembentukan kalus yang tylose dan melindungi jaringan vaskuler dari infeksi patogen.

Subroto dan suputro (2008) menyatakan bahwa fungsi dari flavonoid sebagai antivirus, seperti virus HIV (AIDS) dan virus herpes yang telah banyak dipublikasikan. Selain itu, flavonoid juga dilaporkan berperan penting dalam pencegahan dan pengobatan beberapa penyakit, seperti kanker, asma, katarak, diabetes, encok/rematik, migren, wasir dan periodontitis (radang jaringan ikat penyangga akar gigi), untuk melindungi struktur sel, memiliki hubungan sinergis dengan vitamin C, antiinflamasi dan mencegah keropos tulang.

Flavonoid dan asam fenolik merupakan kelompok utama dari metabolit sekunder dan senyawa bioaktif pada tanaman (Kim dkk, 2003). Keduanya memiliki fungsi sebagai agen pereduksi, anti radikal bebas dan penghambat oksigen tunggal. Selain itu, flavonoid dan fenolik juga berperan penting dalam mengontrol kanker dan penyakit lainnya (Ghasemzadeh dan Ghasemzadeh, 2011). Sementara itu, komponen fenolik penting untuk pertumbuhan tanaman dan reproduksi yang terbentuk sebagai respon dari faktor lingkungan, sebagai contoh cahaya dan suhu yang ekstrim, polusi, dll) dan untuk menghindari luka pada tanaman (Kefeli dkk, 2003).

Selain flavonoid dan fenolik, alkaloid menurut Subroto dan Saputro (2008) memiliki keaktifan farmakologi tertentu, ada yang bersifat racun bagi manusia tetapi banyak juga yang digunakan dalam bidang pengobatan, seperti untuk menaikkan tekanan darah, mengurangi rasa sakit dan dapat melawan infeksi mikroba. Selain itu, fungsi alkaloid bagi tumbuhan antara lain sebagai zat beracun untuk melawan serangga atau hewan pemakan tanaman.

Metabolit sekunder lainnya, yaitu saponin merupakan glikosida dari triterpen dan steroid yang penting di bidang farmasi. Saponin memiliki beberapa peranan ekologis, seperti sebagai pertahanan tanaman terhadap penyakit dan herbivora dan sebagai agen alelopatik pada tanaman kompetitif (Makkar dkk, 2007).

5.2. Luaran yang Dicapai

Luaran yang dicapai adalah :

1. Draft artikel ilmiah
2. Draft buku
3. Sertifikat pemakalah pada Kongres dan Seminar Nasional Biologi XXIV 2017 di Manado.
4. Produk Penelitian : Kalus Tanaman Sarang Semut

BAB 6. RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA

Program tahun kedua meliputi: 1) Hasil dari program tahun pertama berupa ekstrak kalus terbaik diaplikasikan pada program penelitian tahun kedua. 2) Kalus yang memiliki kandungan metabolit terbanyak (dari hasil program tahun pertama), diperbanyak dengan cara di sub kultur sebagai bahan untuk ekstraksi. 3) Ekstrak kalus difraksinasi dengan menggunakan 3 jenis pelarut yaitu *n*-heksan, etil asetat dan etanol. 3) Selanjutnya masing-masing ekstrak kalus pada pelarut yang berbeda diuji untuk melihat kandungan nilai Total Phenolik Content (TPC), nilai Total Flavonoid Content (TFC) dan nilai aktivitas antioksidan. 4). Ekstrak kalus yang mempunyai nilai TPC, TFC dan aktifitas antioksidan tertinggi digunakan untuk menghambat pertumbuhan bakteri patogen dan uji toksisitasnya.

6.1 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan adalah *freeze drying* (Christ Alpha 1-2 LD), timbangan, blender, erlenmeyer, gelas ukur, labu ukur, spatula, *beaker glass*, *rotary evaporator* (Buchi The RII), neraca analitik, tabung reaksi, mikropipet, lemari es, spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UVmini-1240), cuvet, *hot plate*, cawan petri, *autoclave*, *laminar air flow*, spatula, *vortex*, *incubator*, lemari es, lampu bunsen, jarum ose, pinset, jangka sorong, kertas saring, lampu TL 18 watt.

Bahan-bahan yang digunakan adalah kalus tanaman sarang semut, larva *Artemia salina* Leach, air laut, *n*-heksan, etil asetat, alkohol 95%, etanol, aquades, DMSO (*dimetil sulfoksida*), *aluminium foil*, H₂SO₄ 2 M, HCl pekat, pereaksi *Lieberman-Burchard* (CH₃COOH glasial : H₂SO₄pekat), FeCl₃ 1%, pereaksi *dragendroff* (campuran Bi(NO₃)₂.5H₂O dalam asam nitrat dan larutan KI), serbuk Mg, DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhidrazyl*), vitamin C, kloroform-amoniak, dietil eter, *Folin-Ciocalteau*, Na₂CO₃ 20%, asam galat, AlCl₃ 10%, *catechin*, NaNO₂ 5%, NaOH 1 M, larutan NaCl 0,9 %, kertas cakram, kloramfenikol dan media *Mueller-Hinton Agar* (MHA) Oxoid.

6.2 Prosedur kerja

A. Fraksinasi

Fraksinasi bertingkat dilakukan menurut Harborne (1987). Fraksinasi menggunakan pelarut etanol sebagai larutan induk selanjutnya dibuat menjadi ekstrak etanol berbagai fraksi yaitu ekstrak fraksi *n*-heksan dan ekstrak fraksi etil asetat. Ekstrak total dilarutkan dengan etanol lalu ditambahkan *n*-heksan kemudian dikocok dan dibiarkan hingga terbentuk 2 lapisan yaitu fraksi etanol dan fraksi *n*-heksan. Lapisan fraksi *n*-heksan diambil dan dipekatkan dengan *rotary evaporator* dan didapat ekstrak fraksi *n*-heksan.

Fraksi etanol difraksinasi dengan etil asetat. Dari fraksinasi kedua ini diperoleh fraksi etil asetat. Kemudian fraksi etil asetat tersebut dipekatkan dengan *rotary evaporator* dan diperoleh sebagai ekstrak fraksi etil asetat.

B. Uji Fitokimia

1. Penentuan total fenol

Larutan standar asam galat dibuat beberapa konsentrasi (0-250 mg/l) dalam methanol: air (50:50 v/v). Sebanyak 0,5 ml ekstrak tanaman sarang semut dimasukkan ke dalam tabung uji, ditambahkan 5 ml reagen Folin-Ciocalteu dan 4 ml larutan Na₂CO₃ 2%. Selanjutnya diinkubasi pada suhu ruang selama 15 menit. Absorbansinya diukur pada panjang gelombang ±750 nm dengan menggunakan spektrofotometer (Orak, 2007)

2. Penentuan total flavonoid

Penentuan total flavonoid menggunakan Aluminium chloride colorimetric technique (ACCT). Catechin sebagai larutan standar dibuat beberapa konsentrasi (12,5-100 µg/ml) dalam etanol. Sebanyak 0,5 ml ekstrak metanol (ekstrak tanaman sarang semut) dimasukkan ke dalam tabung uji dan ditambahkan 1,5 ml etanol, AlCl₃ 10% sebanyak 0,1 ml, CH₃COOH 1 M sebanyak 0,1 ml dan 2,8 ml akuades. Kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit. Absorbansi diukur pada panjang gelombang ±500 nm dengan menggunakan spektrofotometer, lalu dibuat kurva kalibrasi hubungan antara konsentrasi sampel (mg/l) dengan absorbansi dengan hasil yang didapat (Imran dkk., 2011).

3. Uji Aktivitas Antioksidan

Ekstrak etanol, ekstrak fraksi *n*-heksan dan ekstrak fraksi etil asetat dilakukan uji antioksidan dengan metode perendaman radikal DPPH mengacu pada metode Bouftira et al. (2012). Uji perendaman pereaksi DPPH dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis suhu kamar (37⁰C) dan larutan DPPH digunakan sebagai radikal bebas serta vitamin C sebagai pembanding.

4. Uji Antimikroba

Diusapkan suspensi *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella typhi* ke permukaan media MHA hingga merata. Setelah itu kertas cakram dicelupkan ke dalam ekstrak kalus sarang semut (konsentrasi kontrol (aquades), kloramfenikol 0,1%, 15%, 30%, 45% dan 60%) pada masing-masing pelarut kemudian diletakkan dipermukaan media dan diinkubasi pada suhu 37⁰ C selama 24 jam. Diamati dan diukur zona hambat yang terbentuk.

5. Uji Toksisitas

Uji toksisitas dengan menggunakan metoda BSLT (Urmi dkk., 2013) menggunakan 10-15 ekor larva udang pada setiap botol uji yang kemudian ditambahkan ekstrak kasar tanaman dari masing-masing pelarut. Percobaan dilakukan menggunakan 9 konsentrasi (1000 ppm, 500 ppm, 250 ppm, 125 ppm, 62.5 ppm, 31.2 ppm, 15.6 ppm, 7.8 ppm dan kontrol). Jumlah larva yang mati dihitung dalam waktu 24 jam dan dianalisa untuk menentukan nilai LC₅₀.

6.3 Analisa Data Penelitian

Data kualitatif yang diperoleh disajikan secara deskriptif, sedangkan data kuantitatif disajikan dalam mean \pm SE (Standard Error). Data uji fitokimia nilai TPC, TFC dan aktivitas antioksidan disajikan dalam bentuk grafik. Mean data hasil pengamatan pada uji antibakteri dianalisis menggunakan uji analisis varian (Anava), untuk mengetahui adanya pengaruh perlakuan. Jika ada pengaruh, maka uji dilanjut dengan menggunakan uji Tukey pada taraf $\alpha = 5\%$. Untuk uji toksisitas dihitung mortalitas dan nilai LC₅₀ sehingga diketahui tingkat toksisitas yang dihasilkan ekstrak kalus tanaman sarang semut.

6.4 Indikator Keberhasilan

Indikator keberhasilan adalah: 1) Diperoleh ekstrak kalus dengan pelarut terbaik dalam menghasilkan nilai TPC, TFC, aktivitas antioksidan. 2) Diketuinya potensi yang dimiliki oleh ekstrak kalus dalam menghambat bakteri patogen. 3) Diketuinya daya toksisitas dari ekstrak kalus, sehingga nantinya diharapkan ekstrak kalus tanaman sarang semut berpotensi sebagai antikanker sama atau bahkan lebih dari ekstrak tanaman yang berasal dari alam.

BAB 7. KESIMPULAN DAN SARAN

7.1. Kesimpulan

Dari penelitian yang telah dilakukan dapat dibuat kesimpulan sebagai berikut :

1. Kalus terbaik dihasilkan pada sumber eksplan kotiledon pada kombinasi zpt 2 mg/l 2,4-D + 2 mg/l kinetin. Kalus yang dihasilkan berwarna hijau muda dan hijau kekuningan dengan tekstur remah.
2. Pemberian sukrosa dengan konsentrasi 30 gram memberikan rata-rata pertambahan bobot kalus terbesar yaitu 2,03 gram dengan morfologi kalus berwarna hijau dan tekstur remah.
3. Kandungan metabolit sekunder pada kalus tanaman sarang semut dengan penambahan sukrosa yang berbeda (30, 60, 90 dan 120 g) adalah sama yaitu positif mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, fenolik, saponin dan steroid, dan yang terbaik pada penambahan sukrosa 30 gram.

7.2. Saran

1. Potensi kalus tanaman sarang semut yang begitu besar sebagai bahan fitofarmaka pengganti bahan alam yang memiliki antioksidan yang tinggi dan bersifat antikanker, memerlukan penelitian yang lebih mendalam tentang kandungan metabolit sekunder yang dimiliki oleh kalus (seperti nilai total fenolik, total flavonoid dan DPPH).
2. Perlu uji lanjut aktivitas antimikroba dan uji toksisitas kalus tanaman sarang semut berkaitan dengan kandungan senyawa metabolit sekunder yang dimilikinya.

DAFTAR PUSTAKA

- Afshari R, Angoshtari R, Kalantari S (2011) Effects of Light and Different Plant Growth Regulators on Induction of Callus Growth in Rapeseed ('Brassica napus L.') Genotypes. *Plant Omics* 4(2):60
- Beckman CH (2000) Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants? *Physiological and Molecular Plant Pathology* 57(3):101-110
- Blount JW, Dixon RA, Paiva NL (1992) Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.) XVI. Antifungal activity of medicarpin and its biosynthetic precursors; implications for the genetic manipulation of stress metabolites. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 41(5):333-349 doi:[https://doi.org/10.1016/0885-5765\(92\)90020-V](https://doi.org/10.1016/0885-5765(92)90020-V)
- Chakraborty N, Banerjee D, Ghosh M, Pradhan P, Gupta NS, Acharya K, Banerjee M (2013) Influence of plant growth regulators on callus mediated regeneration and secondary metabolites synthesis in *Withania somnifera* (L.) Dunal. *Physiology and molecular biology of plants : an international journal of functional plant biology* 19(1):117-125 doi:10.1007/s12298-012-0146-2
- Evans DE, Coleman JOD, Kearns A (2003) *Plant Cell Culture*. BIOS Scientific Publisher, New York
- Fowler, M.W. 1983. *Commercial Application and Economic Aspects of Mass Plant Cell Culture*. In: *Plant Biotechnology*. Mantell Smith, H (eds). Cambridge Univ. Press. London
- Ghasemzadeh A, Ghasemzadeh N (2011) Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. *Journal of medicinal plants research* 5(31):6697-6703
- Gardner H. W. 1991. Recent Investigation into The Lipoxygenase Pathway of Plants. *Biochimica et Biophysica Acta* 1084:211–239.
- George EF, Hall MA, De Klerk G-J (2008) Plant growth regulators II: cytokinins, their analogues and antagonists *Plant propagation by tissue culture*. Springer, p 205-226
- George, E. F. and P. D. Sherrington. 1984. *Plant Propagation by Tissue Culture (Handbook and Directory of Commercial Laboratories)*. Eastern Press. England.
- Gunawan, I.W.A. 2008. *Potensi Buah Pare (Momordica charantia L) sebagai Anti Bakteri Salmonella typhimurium*. <http://adigunawan2009.wordpress.com/2009/05/26/potensi-buah-pare-momordica-charantia-1-sebagai-anti-bakteri-salmonella-typhimurium/>. Diakses pada tanggal 30 Oktober 2011.
- Gunawan, L.W. 1992. *Teknik Kultur Jaringan Tumbuhan*. PAU Bioteknologi Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Gunawan, L. W. 1995. *Teknik Kultur In Vitro dalam Holtikultura*. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Harborne, J. B. 1987. *Metode Fitokimia (Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan)*. (diterjemahkan oleh Kosasih, P dan S. Iwang). ITB. Bandung.
- Kala SC, Mallikarjuna K, Aruna P (2014) An efficient protocol devised for rapid callus induction from leaf explants of *Biophytum sensitivum* (Linn) DC. *International Journal of Phytopharmacy* 4(1):20-24
- Kefeli VI, Kalevitch MV, Borsari B (2003) Phenolic cycle in plants and environment. *J. Cell Mol. Biol* 2(1):13-18
- Kiong ALP, Huan HH, Hussein S (2007) Callus induction from leaf explants of *Melaleuca alternifolia*. *Int J Agric Res* 2(3):227-37

- Last DI, Brettell RI (1990) Embryo yield in wheat anther culture is influenced by the choice of sugar in the culture medium. *Plant Cell Rep* 9(1):14-16
- Leupin, R. E. Marianne, L. Charles, E. Karl, H.E and Witholt, B. 2000. "Compact Callus Induction and Plant Regeneration of a Non-Flowering Vetiver From Java". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 62: 115-123. Switzerland.
- Lindsey, K. and M. M. Yeoman. 1983. Novel Experimental System for Studying The Production of Secondary Metabolites by Plant Tissue Culture. In: *Plant Biotech.* Eds. Mantell, S. H & Smith, H. Cambridge University Press. Cambridge.
- Manoi, F. 2008. Sarang Semut (*Myrmecodia*) Tanaman Obat Berpotensi Menyembuhkan Berbagai Penyakit. *Warta Penelitian dan Pengembangan Tanaman Industri* 14 (1).
- Maretzki, A; M. Thom and L. G Nickell. 1974. Utilization and Metabolism of Carbohydrates in Cell and Callus Culture. In: Streer, H. E (Ed). *Tissue Culture and Plant Science*. pp 329-361. Academic Press. London-New York.
- Mogea, J.P dan Welsh, J.R. 1991. *Dasar-dasar Genetika dan Pemuliaan Tanaman*. Erlangga. Jakarta.
- Murashige, T dan Skoog, F (1962). A resived Media for Rapid Growth and Bioassay with Tobacco Tissue Culture. *Physiol Plant* 15. Pp473-497.
- Morini S, D'Onofrio C, Bellocchi G, Fisichella M (2000) Effect of 2,4-D and light quality on callus production and differentiation from in vitro cultured quince leaves. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 63(1):47-55 doi:10.1023/a:1006456919590
- Nagata T, Takebe I (1971) Plating of isolated tobacco mesophyll protoplasts on agar medium. *Planta* 99(1):12-20 doi:10.1007/bf00392116
- Noreen, R; M. A. Khan; M. J. Jaskani and N. Hussain. 2001. Callogenesis and Embryogenesis from Leaf Disks of *Ixora chinensis*. *International Journal of Agriculture and Biology*. 1560-8530. 3(1): 65-67.
- Pal R; K. Girhepunje; A. Upadhayay and N. Thirumoorthy. 2012. Antioxidant and free radical scavenging activity of ethanolic extract of the root of *Morinda citrifolia* (Rubiaceae). *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. ISSN 1996-0816. 6(5): 278-282.
- Parinding, Z. 2007. *Potensi dan Karakteristik Bio-Ekologis Tumbuhan Sarang Semut di Taman Nasional Wasur Merauke Papua*. Sekolah Pascasarjana Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Perry CA, Leigh RA, Tomos AD, Wyse RE, Hall JL (1987) The regulation of turgor pressure during sucrose mobilisation and salt accumulation by excised storage-root tissue of red beet. *Planta* 170(3):353-61 doi:10.1007/bf00395027
- Prachayasittikul S; P. Buraparuangsang; A. Worachartcheewan; C. Isarankura-Na-Ayudhya, S. Ruchirawat and V. Prachayasittikul. 2008. Antimicrobial and Antioxidative Activities of Bioactive Constituents from *Hydnophytum ormicarum* Jack. *Journal Molecules*. ISSN 1420-3049. 13:904-921.
- Purnamaningsih, R. 2006. "Induksi Kalus dan Optimalisasi Regenerasi Empat Varietas Padi melalui Kultur *In Vitro*". *Jurnal Agrobiogen* 2 (2) : 74-80.
- Radha R.K., Shereena S.R., Divya K., Krisnan P.N. and Seeni S. 2011. *In vitro* propagation of *Rubia cordifolia* Linn. A medicinal plant of the western ghats. *Int J Bot* 7:90-96.
- Robbiani, D., T. Nurhidyati dan J. Nurul. 2010. Pengaruh Kombinasi *Naphthalena Acetic Acid* (NAA) dan Kinetin pada Kultur *In Vitro* Eksplan Daun Tembakau (*Nicotiana tabacum* L. var. Prancak 95). Bidang Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Sepuluh November. Surabaya.
- Robinson, T. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. ITB. Bandung.

- Rout GR, Samantaray S, Das P (2000) In vitro somatic embryogenesis from callus cultures of *Cephaelis ipecacuanha* A. Richard. *Scientia Horticulturae* 86(1):71-79 doi:[https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(00\)00130-8](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(00)00130-8)
- Salisbury, F. B. dan C. W. Ross. 1995. *Fisiologi Tanaman. Jilid 3.* (diterjemahkan oleh Diah R.L dan Sumaryono). ITB. Bandung.
- Santoso, U dan F. Nursandi. 2002. *Kultur Jaringan Tanaman.* Universitas Muhammadiyah. Malang.
- Sasmita, T. 2008. Uji Fitokimia dan Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Tumbuhan Sarang Semut (*Myrmecodia tuberosa*) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Salmonella typhi* DNA *Bacillus subtilis*. *Skripsi Sarjana Bidang Biologi.* Universitas Mulawarman. Samarinda.
- Sastrohamidjojo, H. 1996. *Sintesis Bahan Alam.* Gadjah Mada University Press. Yogyakarta
- Sari Y. P., W, Kustiawan, Sukartiningsih and A. Ruchaemi. 2017. The potential of secondary metabolites of *Myrmecodia tuberosa* from different host trees. *Journal Nusantara Bioscience* Vol. 9 (2), pp. 170-174.
- Sari Y.P., dan R. Kusuma. 2015. Modifikasi konsentrasi sukrosa pada media padat dan cair untuk pertumbuhan kalus tanaman sarang semut (*Myrmecodia tuberosa* jack.) secara *in vitro*. *Bio Wallacea Jurnal Ilmiah Ilmu Biologi* Vol. 1 (1) pp 9-13.
- Shahnewaz S, Bari M (2004) Callus Induction and Plant Regeneration in Anther Culture of Rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Tissue Cult* 14(1):37-43
- Shi D. 2014. Effects of culture media and plant growth regulators on micropropagation of Willow (*Salix matsudana* 'Golden Spiral) and Hazel (*Corylus colurna* 'Te Terra Red). University of Nebraska.
- Soeksmanto, A., M. A. Subroto., H. Wijaya dan P. Simanjuntak. 2010. Anticancer Activity Tes for Extracts of Sarang Semut Plant (*Myrmecodia pendens*) to HeLa and MCM-Ba Cells. *Pakistan Journal of Biological Sciences.* 13 (3): 148-151.
- Stella A, Braga MR (2002) Callus and cell suspension cultures of *Rudgea jasminoides*, a tropical woody Rubiaceae. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 68(3):271-276 doi:10.1023/a:1013901909797
- Stobbe H, Schmitt U, Eckstein D, Dujesiefken D (2002) Developmental stages and fine structure of surface callus formed after debarking of living lime trees (*Tilia* sp.). *Annals of Botany* 89(6):773-782
- Subroto, M. A dan H. Saputro. 2008. *Gempur Penyakit Dengan Sarang Semut.* Penebar Swadaya, Jakarta.
- Sudiono, J., C.R. Oka dan P Trisfilha, 2015. The Scientific Base of *Myrmecodia pendans* Herbal Remedies. *British Journal of Medicine & Medical Research.* 8(3):230-237.
- Supriatno. 2014. Antitumor activity of Papua's *Myrmecodia pendans* in Human Oral Tongue Squamous Cell Carcinoma Cell Line Through Induction of Cyclin-dependent Kinase Inhibitor p27Kip1 and Suppression of Cyclin E. *Journal of Cancer Research & Therapy* 2 (3): 48-53.
- Sutopo, L. 2002. *Teknologi Benih.* PT. Raja Grafindo Persada. Jakarta.
- Tambe, N.M. 2013. Studies in *in vitro* callus culture of *Solanum khasianum* Clarke. *International Journal of Recent Trends in Science and Tecnology.* Vol. 5 (3). pp 111-112.
- Waes Jv, Debergh P (1986) In vitro germination of some Western European orchids. *Physiologia Plantarum* 67(2):253-261
- Wattimena, G.A. 1988. *Zat Pengatur Tumbuh Tanaman.* PAU Bioteknologi Bogor. IPB.

- Wetter, L. R. dan F. Constabel. 1991. *Metode Kultur Jaringan Tanaman* (edisi bahasa Indonesia). ITB. Bandung.
- Zulfiqar, Bushra. Akhtar, A.N, Ahmad, T. dan Ishfaq A.H. 2009. “Effect of Explant Sources and Different Concentrations of Plant Growth Regulators on *In Vitro* Shoot Proliferation and Rooting of Avocado (*Persea americana* Mill.)” Pak. J. Bot., 41(5): 2333-2346. Pakistan :*Department of Holticulture Pir Mehr Ali Shah Arid Agriculture, University Rawalpindi.*
- Zulkarnain. 2009. *Kultur Jaringan Tanaman*. Bumi Aksara. Jakarta.

LAMPIRAN

1. Sertifikat seminar nasional



2. Draft artikel ilmiah

CALLUS INDUCTION AND SUCROSE TREATMENT ON THE PRELIMINARY SECONDARY METABOLITE PRODUCTION OF ANT NEST PLANT

YANTI PUSPITA SARI¹✉, EKO KUSUMAWATI¹, CHAERUL SALEH², WAWAN KUSTIAWAN³, SUKARTINGSIH³

¹Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Mulawarman University. Jl. Barong Tongkok No. 4 Kampus Gn. Kelua, Samarinda, 75123, Kalimantan Timur, Indonesia. Tel.: +62-541 747974, Fax: +62-541 747974 ♥email: ypsman2002@yahoo.com

²Department of Chemistry, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Mulawarman University. Jl. Barong Tongkok No. 4 Kampus Gn. Kelua, Samarinda, 75123, Kalimantan Timur, Indonesia

³Faculty of Forestry, Mulawarman University. Samarinda 75123, East Kalimantan, Indonesia

Abstract

The ant nest plant (*Myrmecodia tuberosa* Jack) is a medicinal plant that contains bioactive compounds, such as flavonoids, tannins, tocopherols, phenols, and an abundance of minerals, that are useful as antioxidants. With the constant increase in popularity of the medicinal plant, the *M. tuberosa* is threatened by extinction if over-exploitation continues. Thus, the effort to conserve these plants is vital. Tissue culture is an alternative method to conserve and produce active compounds that are similar to those of the native ant nest plant. The addition of certain compounds such as sucrose can affect the secondary metabolite content through in vitro plant. The aim of this research was to find the explant sources, determine the best growth regulator to produce the callus, and evaluate the optimum sucrose concentration to enhance secondary metabolite production of the callus. The results showed that callus was obtained from all growth regulators. The best callus that was marked by a friable green and yellowish green callus was provided by cotyledon with the growth regulator of 2 mg/Lof 2.4-dichlorophenoxyacetic acid (2.4-D) and 2 mg/Lof kinetin. Calli treated with 30 g of sucrose resulted in the best secondary metabolites, containing alkaloids, phenols, flavonoids, saponins, and steroids.

Keywords: Callus, *Myrmecodia tuberosa* Jack, kinetin, 2.4-D (2.4-dichlorophenoxyacetic acid), sucrose, secondary metabolite

INTRODUCTION

The ant nest plant (*Myrmecodia tuberosa*) is a herbal medicine that contains bioactive compounds, such as glycosides, vitamins, minerals, flavonoids, tocopherols, polyphenols, and tannins (Engida et al., 2013; Sanjaya et al., 2014; Sudiono et al., 2015), which are useful as antioxidants and anticancer compounds. Several researchers have shown that the ant nest plant inhibits the growth of various types of cancer cells, such as those in ovarian cancer (Hasanuddin et al., 2015), oral tongue squamous cell carcinoma (OTSCC) (Supriatno, 2014), lung and colon cancer (Manoi, 2008; Subroto and Saputro, 2008), and HeLa and MCM-B2 cell cancer (Soeksmanto et al., 2010). Another report showed that the ant nest plant

has anti-microbial bioactivity and antioxidants (Prachayasittikul et al., 2008).

The popularity of the ant nest plant as a pharmaceutical plant has caused many people to hunt for it directly from nature. The over exploration of the *Myrmecodia* plant without cultivation might decrease the population. Thus, there is an urgent need to restore the natural population of this plant and use an alternative pharmaceutical source without taking it directly from nature.

The tissue culture method is an alternative method to provide raw material to produce a medicinal compound to achieve great benefits in the pharmaceutical aspect (Radha et al., 2011) and to select genotypes that have considerable amounts of bioactive compound

(Cantelmo et al., 2013). Generally, organ culture, cell suspension, and callus culture have been used to study secondary metabolite synthesis using the tissue culture method (George and Sherrington, 1984). Massive development through tissue culture has indicated that it does not affect the active compound content from the plants. Past research has revealed that sucrose has a positive effect on the production of secondary metabolites both in cell and organ cultures (Fowler, 1983; Paiva and Janick, 1982).

The successful tissue culture depends on factors such as the medium, growth regulator, explant source, and environment. In addition, the successful tissue culture has been also affected by the types and concentration of the growth regulator added in the medium (Shi, 2014). Auxin, cytokinin, and gibberellin are growth regulators usually used in tissue culture (Coggins Jr and Lovatt, 2014; Davies, 2010; Erland et al., 2017). One of the auxins that is useful to induce callus formation is 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), which is a synthetic growth regulator (Phua et al., 2016; Welsh and Moge, 1991). Proper interaction between auxin and cytokinin enhances callus growth.

Past researchers have stated that the biggest callus was obtained with 4.44 μM of BA and 4.52 μM of 2,4-D in *Solanum khasianum* (Tambe, 2013) and 3.0 mg/L of 2,4-D in *Gardenia latifolia* (Mohan Reddy and Saritha, 2012). Meanwhile, Sari and Kusuma (2015) revealed that an ant nest plant callus was formed in solid and liquid Murashige and Skoog (MS) medium with 2,4-D (2 ppm) and kinetin (2 ppm). In addition, a high quality of callus can be produced using specific nutrients and manipulating nutrient components in the culture medium (e.g., carbon source, nitrogen, and phosphate) to induce cell growth for effectiveness of secondary metabolite production (Trejo-Tapia et al., 2001).

Based on the information above, the purpose of this research was to determine the optimum combination of growth regulators (2,4-D: 0.5, 1, 1.5, and 2 mg/L and kinetin 2 mg·L⁻¹) and explant source (cotyledon, stem, tuber, and root) on callus production in the ant nest plant using an in vitro method. The research was also aimed to evaluate the optimum sucrose concentration to enhance

secondary metabolite production from the callus.

MATERIALS AND METHODS

Plant Material

Nuts of the ant nest plant were provided from the ripe fruit, which were collected from Antutan village, Tanjung Palas regency, Bulungan district, North Borneo.

Sample Preparation

Seeds were sterilised using 70% alcohol for 1 minute, followed by 30%, 20%, and 10% sodium hypochlorite for 10 minutes each and washed three times for 5 minutes in sterile conditions. In germination, seeds were placed in MS medium and agar (0.75%) with 30% sucrose (Murashige and Skoog, 1962).

Seed Germination

Sterile seeds of the ant nest plant were grown in glass bottles, containing MS0, incubated in a culture room with a light intensity of $\pm 1000\text{--}2000$ Lux with a temperature of 20°C–25°C. After one month, the plant was used as an explant source, which was grown in a callus formation medium. The cotyledon, hypocotyl, tuber, and root were used as explant sources.

Callus Formation

Cotyledon from a month-old plant was prepared to use as an explant source. The explant was grown in MS with a growth regulator combination of 2,4-D (0.5, 1, 1.5, and 2 mg·L⁻¹) and kinetin (2 mg·L⁻¹), incubated in a tissue culture room with a light intensity of $\pm 1000\text{--}2000$ lux with a temperature of 20°C–25°C for 10 weeks.

Sucrose Treatment

The best callus from induction was used in sucrose treatment. The 0.5 g callus was weighed and placed in the MS medium that was added with different concentrations of sucrose (30, 60, 90, and 120 g). After 8 weeks, secondary metabolite content was determined from each callus.

Secondary Metabolite Extraction

The callus was extracted using ethanol as a solvent for 48 h. The extraction process continued until the extraction solution become unicolour (± 48 h) followed by filtration using Whatman paper (Whatman 2; Sigma-Aldrich, Germany). After filtration, a rotary evaporator was used to evaporate the remaining solvent. The extracted ethanol was then collected to be used as a sample extract in the phytochemical

test to determine the phytochemical contents in the ant nest plant extract.

Phytochemical Test

To detect the presence of possible phytochemicals in the sample extract, some phytochemicals, such as alkaloids, flavonoids, phenols, saponins, and steroids/triterpenoids, were tested, following the methods of Pal et al. (2012). For the alkaloid test (Mayer's test), 1 mL of Wagner's reagent was added to the extract sample. The formation of a white precipitate indicates a positive test. In the flavonoid test (Shinoda's test), 5 mL of extract and 1 mL of concentrated hydrochloric acid and magnesium ribbon were mixed and shaken. The appearance of a pink-red colour indicates the presence of flavonoids. For the phenolic test, the extract sample was mixed with a few drops of 1% solution of FeCl_3 . A blue-green or black colouration indicates the presence of phenol. In the saponin test (foam test), the extract sample was added to 10 mL of distilled water, cooled, air dried, and shaken vigorously for 10 s. The appearance of stable foam (1-3 height) indicates the presence of saponin. In the

steroid/triterpenoid test (Liebermann–Burchard test), CH_3COOH glacial and absolute H_2SO_4 were added to the sample extract with a ratio of 20:1. The appearance of a blue or green colour indicates the presence of steroids, and the appearance of a red or brown colour indicates the presence of triterpenoids.

Data Analysis

The results were presented as descriptive data. Callus induction was observed at the first growth of the callus along with the percentage of callus growth, callus morphology (texture and colour), and callus growth intensity. For the phytochemical test, the presence or absence of phytochemicals such as alkaloids, flavonoids, phenols, saponins, triterpenoids, and steroids in the extract was indicated as positive (presence) or negative (absence).

RESULTS AND DISCUSSION

Seed Germination

The seeds of the ant nest plant that were grown in MS0 started to grow at day 3 after planting and reached full growth as a plant at day 30 (Figure 1).

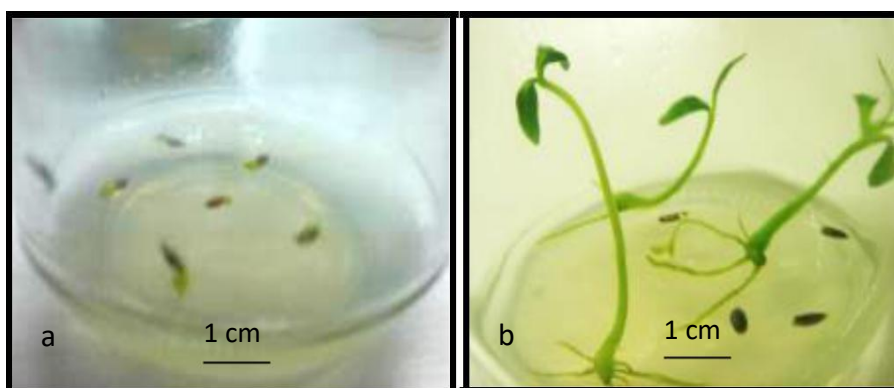


Figure 1. Seed germination of the ant nest plant (*Myrmecodia tuberosa*) in MS0 medium: a) 3 days and b) 30 days.

Seed germination is a mechanism related to the alteration of both morphological and physiological aspects, which is caused by embryo activation. The process of embryo expansion and elongation is a process that is initiated by absorbing water by the seed before germination. The germination process is terminated when the radicle has completely grown out to cover the seed layers (Hermann et al., 2007).

Seed germination of the ant nest plant using tissue culture was affected by two types

of factors: internal and external factors. The internal factors include the endosperm (food stores) and the level of seed maturity. In agreement with the findings by Miransari and Smith (2009), for the seed to germinate, a set of stages must be complete, including the availability of food stores in the seed. Such food stores include starches, proteins, lipids, and nutrients, which become available to the seed embryo through the activity of specific enzymes and pathways. Müller et al. (2013) added that the activity of the enzyme pectin

methylesterases is also influenced in seed germination. Further, the homogalacturonans of the wall, a methylesterified, are facilitated by the enzyme that affects the cell-wall porosity and elasticity, causing cell growth and water uptake. Meanwhile, during the process of seed germination, the expansion of the cell wall of the radicle and of the tissues also must occur.

Besides internal factors, seed germination is also affected by external factors, such as medium composition. The successful seed germination of the ant nest plant in a brief time is influenced by the MS medium composition, which contains several amino acids that might boost seed germination. Waes and Debergh (1986) reported that the addition of amino acids, such as serine, glutamic acid, peptone, hydrolysate casein, and yeast extract, in the medium induce seed germination. In comparison with other salt formation, MS inorganic salts have high contents of nitrate, potassium, and ammonium. The MS medium also contains high macro and microelements and inorganic salts that are sufficient to support the optimum growth of the plant. In addition, the concentration and quality of nitrogen in the

MS medium contribute in the prolific growth obtained with plant-derived seed types that are incubated in this medium. Thus, the nitrogen supplied in the medium is in inorganic form as the anion NO_3 or the cation NH_4 . According to Malmgren (1996), the ammoniated form of nitrogen is more beneficial than the nitrate form, which is proved by the fastest growth of the *Dactylorhiza* species seedlings at 50–100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NH_4NO_3 . Similar results were found from past research, which revealed that an efficient concentration of organic and inorganic nitrogen sources can be used to promote the growth of explants (Chen and Chang, 2002). The 30-day old ant nest plant was used as an explant source to be grown in the initial medium treatment. Cotyledon, hypocotyl, tuber, and root were then used as sources of explant.

Callus Induction

Callus induction of cotyledon, stem, tuber, and root explants of the ant nest plant was affected by the combination of growth regulators 2.4-D and kinetin (Table 1).

Table 1. Effects of 2.4-D and kinetin composition on the callus induction of the ant nest plant (*Myrmecodia tuberosa* Jack) from the cotyledon, stem, tuber, and root explants at week 10.

Explant	Growth Regulator		Percentage of Callus Formation (%)	Callus Formation Time (week)	Callus Morphology		Callus Intensity
	2.4-D $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	Kinetin $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$			Colour	Texture	
Cotyledon	0.5	0.0	100	2	Yellow	Friable	++
	1.0	0.0	100	2	Yellow	Friable	++
	1.5	0.0	100	2	Yellowish green	Friable	++
	2.0	0.0	100	2	yellowish green	Friable	++
	0.5	2.0	100	2	Yellowish green	Friable	+++
	1.0	2.0	100	2	Yellowish green	Friable	+++
	1.5	2.0	100	2	Yellowish green	Friable	+++
	2.0	2.0	100	2	Green-yellowish green	Friable	+++
Stem	0.5	0.0	100	2	Yellowish green	Friable	++
	1.0	0.0	100	2	Yellow	Friable	++
	1.5	0.0	100	2	Yellowish green	Friable	++
	2.0	0.0	100	2	Yellow	Friable	++
	0.5	2.0	100	2	Yellow	Friable	+++
	1.0	2.0	100	2	Yellowish green	Friable	+++
	1.5	2.0	100	2	Yellowish green	Friable	+++
	2.0	2.0	100	2	Yellowish green	Friable	+++
Tuber	0.5	0.0	100	2	Yellowish green	Friable	++
	1.0	0.0	100	2	Yellowish green	Friable	++
	1.5	0.0	100	2	Yellowish green	Friable	++
	2.0	0.0	100	2	Yellow	Friable	++
	0.5	2.0	100	2	Yellowish green	Friable	+++

Explant	Growth Regulator		Percentage of Callus Formation (%)	Callus Formation Time (week)	Callus Morphology		Callus Intensity
	2,4-D mg·L ⁻¹	Kinetin mg·L ⁻¹			Colour	Texture	
Root	1.0	2.0	100	2	Yellow	Friable	+++
	1.5	2.0	100	2	Yellow	Friable	+++
	2.0	2.0	100	2	Pale green	Friable	+++
	0.5	0.0	100	2	Pale green	Friable	+
	1.0	0.0	100	2	Pale green	Friable	+
	1.5	0.0	100	2	Yellowish green	Friable	++
	2.0	0.0	100	2	Yellowish green	Friable	++
	0.5	2.0	100	2	Yellowish green	Friable	+++
	1.0	2.0	100	2	Yellowish green	Friable	+++
1.5	2.0	100	2	Yellowish green	Friable	+++	
2.0	2.0	100	2	Yellowish green	Friable	+++	

Note: + = low, ++ = intermediate, +++ = high.

All treatment combinations of growth regulators resulted in calli with a percentage of 100%. A callus is a collective form of disorganised cell masses. The formation of callus via growth and accumulation of cells has a relationship with wounding. Further, a single differentiated cell and other totipotent cells could produce a callus that can regenerate the whole plant body (Nagata and Takebe, 1971). The callus is formed at 2 weeks of age, marked by explant swelling and callus formation in the edge, slice, or lesion of the explant. The callus is quickly formed at the leaf surface. This is related to the uptake nutrition in the medium by the explant. The absorption of nutrients is even better with direct contact between the medium and explant.

This result was in line with previous research performed by Morini et al. (2000), which revealed that the callus formation of quince leaves was found only in the abaxial surface part. The appearance of the callus on the injured part might be because of the excitement of the tissue on the explant to cover the wound. Explant response on the treatment medium is started with explant swelling or elongation. The size of the explant becomes bigger from the beginning, and the callus begins to form on part of the injured explant. The combination of auxin (2,4-D) and cytokinin (kinetin) as growth regulators on the MS medium can induce callus formation, both in single and combination treatments. The callus began to appear on the edge of the explants and on the wounded parts and continued to grow until the end of the observation at 10 weeks after planted. In addition, Stobbe et al. (2002)

revealed that the wound-induced calli regenerate new organs or new tissues, suggesting that they are highly pluripotent.

In 2,4-D without kinetin, callus growth response in all explants (cotyledon, stem, tuber, and root) with a small callus needed extended time to grow bigger. This suggests that the ant nest plant callus cannot grow optimally with a single auxin administration without the addition of a growth regulator from the cytokine group. According to Kala et al. (2014), the growth regulators cannot induce a callus from *C. parviflorum* leaf explants. However, the combinations of growth regulators resulted in optimum callus production. Callus formation is strongly influenced by the type and concentration of the growth regulator. Zulfiqar et al. (2009) revealed that the growth and morphogenesis of plants in vitro are controlled by the balance and interaction of the growth regulator that was absorbed from the media. Auxins play a role in stimulating the growth of explant cells; thus, auxin tends to form a callus that begins from cell division in the meristematic area. At the beginning of the growth response, auxin triggered the elongation of cells through loosening the cellulosic cell wall. This elongation of the cell was due to the response of 2,4-D, but the cell cannot divide rapidly because there was no addition of kinetin. The combination of the growth regulators, 2,4-D and kinetin, in all explant sources (cotyledons, stems, tubers, and roots) resulted in a larger callus size compared to only 2,4-D. In line with past research (Rout et al., 2000), the combination of 2,4-D and kinetin resulted in the largest callus of *Cephaelis*

ipecacuanha and *Melaleuca alternifolia* (Kiong et al., 2007). Stella and Braga (2002) used a combination of auxin (picloram) and cytokinin (kinetin) in the callus of *Rudgea jasminoides*. The best callus was found through the addition of 2 mg/Lof 2.4-D and 2 mg/Lof kinetin in all explants that were used. In addition to the larger callus size, the resulting callus had a more intensive green colour with friable callus texture. The large callus size might be due to the corresponding concentration of growth regulators, causing rapid cell division in the ant nest explants. The callus can be provided with two plant hormones, auxin and cytokinin in a balanced condition.

a. Callus colour

The results of the observation for 10 weeks after planting found that the combination of growth regulator 2.4-D and kinetin on the MS

medium induced the formation of a callus on various explants from the ant nest plants (Figure 2). The colour of the calli at all treatments ranged from yellow and yellowish green to pale green and green. The resulting colour variations might be due to the diverse types of growth regulators, the difference in growth regulator concentration, and the type of explant. Compare to only auxin, a combination of auxin and cytokinin resulted in a callus colour that was more green, caused by cytokinin, which tends to promote chlorophyll formation (George et al., 2008). According to Afshari et al. (2011), various callus colour conditions could be caused by the pigmentation, the influence of light, and the plant parts used as the source explant.

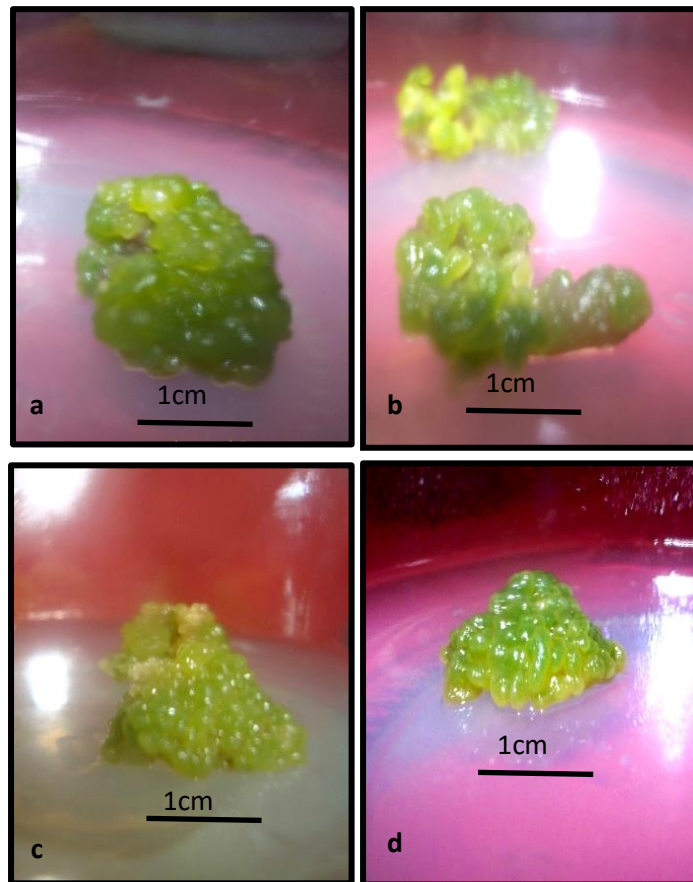


Figure 2. Optimum calli at a concentration of 2 mg/Lof 2.4-D and 2 mg/Lof kinetin at 10 weeks after planting in explant: a = cotyledon, b = stem, c = tuber, and d = root.

Based on the callus colour (Figure 2), the addition of 2 mg/Lof 2.4-D and 2 mg/Lof kinetin resulted in assorted colours from pale green and yellowish green to green. The green

colour of the callus of the ant nest plant was because of the chlorophyll content. The chlorophyll was formed in the callus due to the addition of the growth regulator 2.4-D and

kinetin. Kinetin from the cytokinin group is involved in the chlorophyll formation in the callus along with the existence of light. This finding was in line with previous research by Leupin et al. (2000), which reported that the colour change in callus to green was because of chlorophyll formation.

Meanwhile, the yellow to yellowish green callus (Table 1) was found because of the kinetin concentrations added into the media, which had a lower concentration than 2.4-D. Kinetin as a cytokinin stimulated chlorophyll formation, whereas auxin can be an inhibitor. According to George and Sherrington (1984), the decrease in the formation of chlorophyll with 2.4-D was found in the culture of peas and potatoes. In addition, the yellow colour callus was also caused by the chlorophyll degradation process, lack of kinetin, and low kinetin concentration. In addition, kinetin plays a role in the formation of chlorophyll, causing the green colour to appear.

b. Callus texture

Table 1 shows friable callus was found in calli with all treatments. The friable callus was formed through the growth of cells at a small size and loose cell interaction that was affected by the occurrence of auxin. Previous researchers reported that 2.4-D stimulated cell elongation by increasing of plasticity of the cell wall to become loose, causing water to easily flow to the inner cell by osmosis, causing the cell to become elongated (Robbiani et al., 2010). Thus, friable calli contain much water because the wall cell has not reached lignification yet, and the group of cells can be easily separated from the others. The callus texture from the explant can be distinguished as friable and non-friable. The non-friable callus has compact and tight cells that are difficult to separate. In contrast, a friable callus from an explant has loose cell interaction that is easily detached using tweezers.

The addition of growth regulator with a combination of 2.4-D and kinetin on various explants formed a friable texture in the callus (Figure 2). The friable callus was also obtained in a study conducted by Sari and Kusuma (2015), which stated that the friable callus was also obtained on ant nest cotyledons planted in solid and liquid MS media. In line with Chakraborty et al. (2013), the MS medium with 2.4-D ($0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) and kinetin ($0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)

resulted in the best explant *Withania somnifera* (L.) for callusing with soft, friable, and greenish white features. The addition of growth regulators in the medium caused the callus cells to be active in cell division and cell enlargement, raised the osmotic pressure, and increased protein synthesis.

The current visual results indicate that the appearance of the callus with only the 2.4-D and with the 2.4-D and kinetin combination produced a friable callus and formed nodules (globular). This indicated that the callus can be further grown into shoots or plantlets. Purnamaningsih (2016) stated that the callus structure usually describes regeneration potency to form buds and roots. The friable callus has a higher ability to form buds than the compact callus. In this case, the growth regulator increased callus regeneration. In addition, the growth of the callus was also greatly affected by the nutrient balance.

Sucrose Treatment

The weight gain of the callus was significantly affected by different concentrations of sucrose. The average weight gain of the callus is shown in Table 2.

a. Callus morphology

Callogenesis is the initial response, characterised by the formation of the callus, which starts from the edge of the explant (wounded part) at the top and bottom that has direct contact with the medium. The callus is formed faster on the part that has direct contact with the media. This is probably related to the process of nutrient uptake in the medium by the explant. The appearance of the callus on the wounded part might be caused by the excitement of the tissue on the explant to cover the wound. George and Sherrington (1984) stated that the cell division that leads to the callus formation occurs from the injuries and both the natural and artificial hormone supply from the outside into the explant.

Light is an external factor that influences callus formation. The colour change that exists in the callus was because of pigment, nutrients, and environmental factors, such as light (Evans et al., 2003). George and Sherrington (1984) stated that a white light could induce callus formation and organogenesis in the plant tissue.

Table 2. Callus morphology and average of weights of the callus of the ant nest plant (*Myrmecodia tuberosa*) treated with different concentrations of sucrose for 8 weeks.

Sucrose (g)	Callus Morphology		Mean Weight of Callus (g)
	Colour	Texture	
30	Green	Friable	2.12 ± 0.40 ^d
60	Green-yellowish green	Friable	1.60 ± 0.18 ^c
90	Yellowish green	Friable	1.15 ± 0.28 ^b
120	Yellowish green	Friable	0.68 ± 0.69 ^a

Note: Different letters (a, b, c) indicate significantly different means for different treatments at $p < 0.05$ using Tukey's test.

A callus that has yellowish green and green colour was formed with the addition of kinetin. The green colour was because of chlorophyll, resulting from the 2.4 D interaction with kinetin, mainly because kinetin (cytokinin) has a function in the formation of chlorophyll in the callus and due to environmental factors, such as exposure to light. Leupin et al. (2000) claimed that the colour change in the callus from white to green was due to chlorophyll formation.

b. Callus growth

The largest mean of callus weight of the ant nest plant was found in sucrose-treated medium at 30 g·L⁻¹ (Table 2). However, the sucrose-treated medium leads to reduced callus weight. In the treatment of 60 g·L⁻¹, sucrose decreased the weight of the callus to 1.60 g. This was due to the increasing concentration of medium that inhibited the absorption of water and minerals. These inhibitory effects were found in the 90 and 120 g·L⁻¹ sucrose-treated medium, resulting in a mean weight of callus of 1.15 and 0.68 g. Based on the current results, it can be estimated that the sucrose-treated medium above 30 g·L⁻¹ can inhibit the growth of the *M. tuberosa* callus. Lindsey and Yeoman (1983) stated that the inhibition of growth in cultures that produced secondary metabolites is probably due to a competition between primary metabolism and secondary metabolism for the same substance. The *M. tuberosa* plant is a medicinal plant for which the callus formation in the tissue culture also has the same secondary metabolite content with the original plant in nature.

The current results found that the callus colour ranged from green to yellowish green.

The callus colour indicates the presence of chlorophyll in the tissues. The green callus was present in MS-treated medium with a sucrose concentration of 30 and 60 g·L⁻¹. The greener colour callus indicates more chlorophyll content, which can support the growth of the callus. The yellowish green callus was also found in the sucrose treatment with different concentrations: 90 and 120 g·L⁻¹. The resulting colour variation was caused by the difference in sucrose concentration in each treatment. This finding is in agreement with that of George and Sherrington (1984) in which sucrose in the tissue culture media can inhibit chlorophyll synthesis with varying levels of inhibition, depending on the tissue and plant species. The accumulation of sucrose in cells can also inhibit the process of photosynthesis because of the accumulation of sucrose in the cell, causing the demand of sugar in the cell to be fulfilled. As a result, the cells inhibit photosynthesis and the formation of chlorophyll.

Growth in tissue culture can be characterised by the increase of the wet weight of the callus. Physiologically, the weight of the wet callus consists of water and carbohydrates that have a relationship with sucrose in the culture medium as a carbon source and osmotic regulator, which is critical for embryoid and callus formation (Last and Brettell, 1990). Sucrose can be rapidly hydrolysed to form glucose and fructose, increasing the osmolality of the medium. In this study, the sucrose-treated medium entered the plant cell through diffusion and osmosis processes.

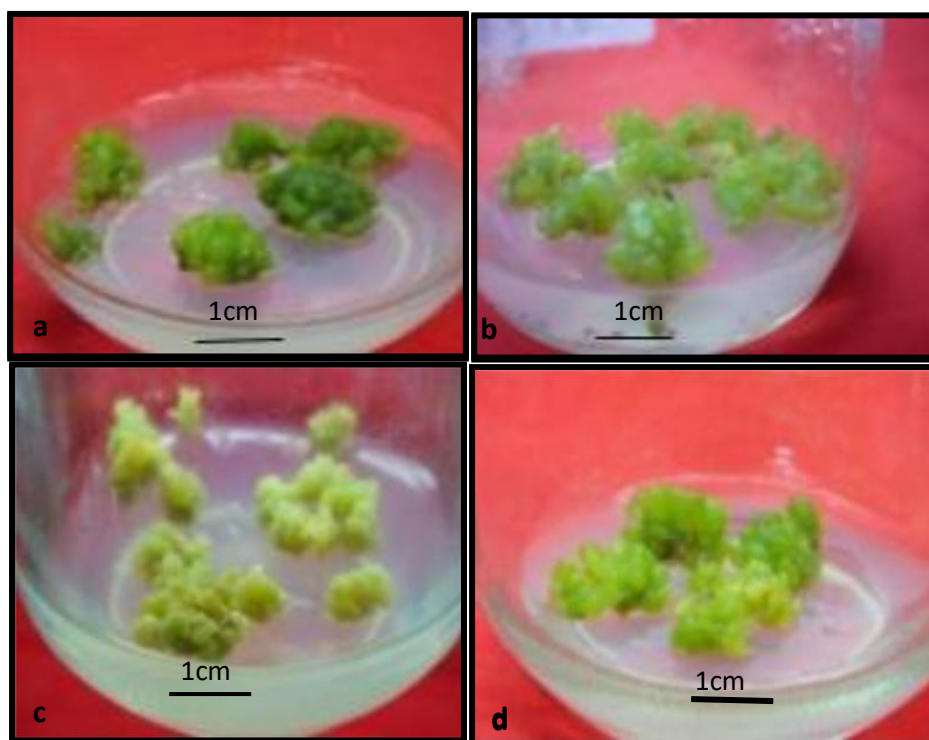


Figure 3. Callus of the ant nest plant (*Myrmecodia tuberosa*) with different concentrations of sucrose: a = 30 g·L⁻¹, b = 60 g·L⁻¹, c = 90 g·L⁻¹, and d = 120 g·L⁻¹ for 8 weeks.

Shahnewaz and Bari (2004) revealed that the effect of sucrose concentration influences the callus induction frequency that might be due to its contribution to the osmotic potential of the medium instead of its utilisation as a carbon source.

In cell metabolism, glucose and fructose enter into the glycolysis and Krebs cycle to form ATP to be used for callus growth. Perry et al. (1987) revealed the change in solute content (e.g. carbon source) could cause various

change in turgor and osmotic turgor. In tissue culture, turgor pressure might cause elongation and magnification of callus cells. Furthermore, turgor pressure might be different in each cell, and the cell growth response to the addition of carbohydrates also varies for each species.

Phytochemical Test

The phytochemical test results of the callus of the ant nest plant with different concentrations of sucrose are shown in Table 3.

Table 3. Phytochemical screening test of the ant nest plant callus with different sucrose concentrations.

Sucrose (g)	Flavonoid	Phenol	Alkaloid	Saponin	Steroid	Triterpenoid
30	++	++	++	++	++	-
60	+	+	+	+	+	-
90	+	+	+	+	+	-
120	+	+	+	+	+	-

The phytochemical test on the ant nest plant calli treated with different sucrose concentrations found that metabolite content was positive from each treatment, which contained flavonoids, phenols, alkaloids, and

steroids, whereas a negative result was found for triterpenoid. The best sucrose treatment was obtained with the addition of 30 g, resulting in a more concentrated test colour than the others. There was no change in metabolite content

between the ant nest plant callus from the tissue culture and from nature. Sari et al. (2017) stated that all parts of the ant nest plant (tuber, stem, and leaves) from nature contained phenols, flavonoids, saponins, and alkaloids but not triterpenoid. According to Fowler (1983), the tissue culture method can be used to produce chemical compounds that are usually derived from the native plant as well as new compounds synthesis, which is not produced by the plant. The secondary metabolites synthesised from the explant with the tissue culture depend on the culture condition. The proper culture produces secondary metabolites that are similar to those of the native plant. Based on the utilisation aspect, ant nest plants have various chemical compounds. The chemical compounds from this plant might have a role in the activity of pathogenic resistance, allelopathy, and body defence against pest attacks. The compounds are utilised by the plants as a self-defence system, while for humans, they are used as an active ingredient for medicine. According to Subroto and Saputro (2008), ant nest plants are rich in tocopherol antioxidants (vitamin E) and some important minerals (calcium) for the body.

Koes et al. (2005) stated that flavonoids can be synthesised in all parts of the plant that have a pivotal role in providing colour, fragrance, and taste to the fruits, flowers, and seeds, which makes them attractants for insects, birds, or mammals and aids in pollen or seed transmission. In addition, Blount et al. (1992) stated that flavonoids that are very important in plant resistance against pathogenic bacteria and fungi also have antipathogenic properties that can be non-specific and result, in part, from their antioxidative properties. Moreover, Beckman (2000) added that flavonoids affect the tightening of the plant structures and tissues by stimulating auxin (IAA) activity, which promotes the differentiation of tissues and promotes of callus and tylose formation and the closure of the vascular system to protect against pathogen infection.

Subroto and Saputro (2008) claimed that the function of flavonoids as an antiviral, including for the HIV virus (AIDS) and herpes virus, has been widely published. Moreover, flavonoids are also reported to play a pivotal role in the prevention and treatment of several diseases, such as cancer, asthma, cataracts, diabetes, gout, rheumatism, haemorrhoids, and

periodontitis (inflammation of the connective tissue of the tooth root), protecting the cell structure, having a synergistic relationship with vitamin C, and are anti-inflammatory and prevent bone loss.

Flavonoids and phenolic acids are major groups of secondary metabolites and bioactive compounds in plants (Kim et al., 2003). Both have a function as reducing agents, free radical scavengers, and quenchers of singlet oxygen formation. In addition, flavonoids and phenolic acid components play important roles in the control of cancer and other human diseases (Ghasemzadeh and Ghasemzadeh, 2011). Meanwhile, phenolic compounds that are important for plant growth and reproduction are formed as a response to environmental factors, for example, light and chilling, pollution, etc.) and to defend wounded plants (Kefeli et al., 2003).

Besides flavonoids and phenols, alkaloids have certain pharmacological activity. Some of them are toxic to humans, but many also can be used in the medicinal field, such as to raise blood pressure, reduce pain, and fight microbial infections. In addition, alkaloids for plants, among others, function as toxic substances to fight insects or plant-eating animals (Subroto and Saputro, 2008).

Another secondary metabolite, namely, saponin, a glycoside of triterpenes and steroids, is important for pharmaceuticals. Moreover, the underexplored biodiversity of plant saponins is likely to prove to be a vital resource for future drug discovery. Saponin is also one of the most numerous and diverse groups of natural plant products that serve a range of ecological roles, including plant defence mechanisms against disease and herbivores and possibly as allelopathic agents in competitive interactions between plants (Makkar et al., 2007).

CONCLUSION

The best callus was obtained from the cotyledon explant source with the combination of growth regulator of 2 mg/Lof 2.4-D and 2 mg/Lof kinetin. The callus was marked by friable texture with green and pale green colour. The highest average callus wet weight gain (2.12 g) that has friable texture and green colour was found with the addition of 30 g of sucrose. Alkaloids, flavonoids, phenols, saponins, and steroids were found in the secondary metabolites of the ant nest plant

callus with any concentration (30, 60, 90, and 120 g) of sucrose, and the optimum concentration was found to be 30 g of sucrose.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the Indonesian Government through the Ministry of Research and Technology, General Higher Education (KEMENRISTEK DIKTI) (penelitian unggulan perguruan tinggi/pupt) contract number 359/un17.41/kl/2017 for financial support.

REFERENCES

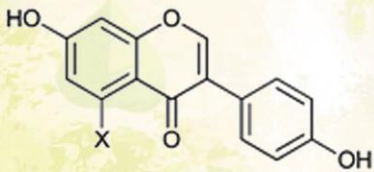
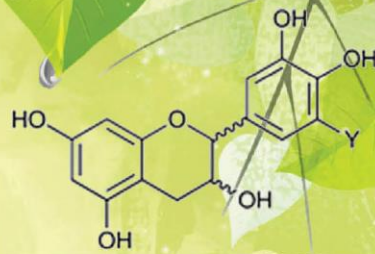
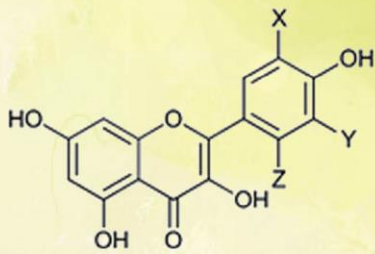
- Afshari, R., R. Angoshtari, and S. Kalantari. 2011. Effects of Light and Different Plant Growth Regulators on Induction of Callus Growth in Rapeseed (*Brassica napus* L.) Genotypes. *Plant Omics* 4: 60.
- Beckman, C. H. 2000. Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants? *Physiological and Molecular Plant Pathology* 57: 101-110.
- Blount, J. W., R. A. Dixon, and N. L. Paiva. 1992. Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.) XVI. Antifungal activity of medicarpin and its biosynthetic precursors; implications for the genetic manipulation of stress metabolites. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 41: 333-349.
- Cantelmo, L. et al. 2013. Repetitive somatic embryogenesis from leaves of the medicinal plant *Petiveria alliacea* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 115: 385-393.
- Chakraborty, N. et al. 2013. Influence of plant growth regulators on callus mediated regeneration and secondary metabolites synthesis in *Withania somnifera* (L.) Dunal. *Physiology and molecular biology of plants : an international journal of functional plant biology* 19: 117-125.
- Chen, J.-T., and W.-C. Chang. 2002. Effects of tissue culture conditions and explant characteristics on direct somatic embryogenesis in *Oncidium 'Gower Ramsey'*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69: 41-44.
- Coggins Jr, C. W., and C. J. Lovatt. 2014. 14 Plant Growth Regulators. *Citrus Production Manual* 3539: 215.
- Davies, P. J. 2010. The plant hormones: their nature, occurrence, and functions *Plant hormones*. p 1-15. Springer.
- Engida, A. M. et al. 2013. Extraction, identification and quantitative HPLC analysis of flavonoids from sarang semut (*Myrmecodia pendan*). *Industrial Crops and Products* 41: 392-396.

- Erland, L. A., M. R. Shukla, W. B. Glover, and P. K. Saxena. 2017. A simple and efficient method for analysis of plant growth regulators: a new tool in the chest to combat recalcitrance in plant tissue culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*: 1-12.
- Evans, D. E., J. O. D. Coleman, and A. Kearns. 2003. *Plant Cell Culture*. BIOS Scientific Publisher, New York.
- Fowler, M. 1983. Commercial applications and economic aspects of mass plant cell culture. In: *Seminar series-Society for Experimental Biology*
- George, E. F., M. A. Hall, and G.-J. De Klerk. 2008. Plant growth regulators II: cytokinins, their analogues and antagonists *Plant propagation by tissue culture*. p 205-226. Springer.
- George, E. F., and P. D. Sherrington. 1984. *Plant propagation by tissue culture (Handbook and directory of commercial laboratories)*. Eastern Press, England.
- Ghasemzadeh, A., and N. Ghasemzadeh. 2011. Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. *Journal of medicinal plants research* 5: 6697-6703.
- Hasanuddin, K., G. Supriadi, D. Kurnia, and D. Adhita. 2015. Potential of terpenoid bioactive compound isolated from Papua ant nest as an alternative ovarian cancer treatment. *Open Journal of Obstetrics and Gynecology* 5: 406-411.
- Hermann, K. et al. 2007. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid and abscisic acid during the germination of sugar beet (*Beta vulgaris* L.): a comparative study of fruits and seeds. *Journal of Experimental Botany* 58: 3047-3060.
- Kala, S. C., K. Mallikarjuna, and P. Aruna. 2014. An efficient protocol devised for rapid callus induction from leaf explants of *Biophytum sensitivum* (Linn) DC. *International Journal of Phytopharmacy* 4: 20-24.
- Kefeli, V. I., M. V. Kalevitch, and B. Borsari. 2003. Phenolic cycle in plants and environment. *J. Cell Mol. Biol* 2: 13-18.
- Kim, D.-O., S. W. Jeong, and C. Y. Lee. 2003. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food chemistry* 81: 321-326.
- Kiong, A. L. P., H. H. Huan, and S. Hussein. 2007. Callus induction from leaf explants of *Melaleuca alternifolia*. *Int J Agric Res* 2: 227-237.
- Koes, R., W. Verweij, and F. Quattrocchio. 2005. Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways. *Trends in plant science* 10: 236-242.
- Last, D. I., and R. I. Brettell. 1990. Embryo yield in wheat anther culture is influenced by the choice of sugar in the culture medium. *Plant Cell Rep* 9: 14-16.
- Leupin, R. E., M. Leupin, C. Ehret, K. H. Erismann, and B. Witholt. 2000. Compact callus induction and plant regeneration of a non-flowering vetiver from Java. *Plant cell, tissue and organ culture* 62: 115-123.
- Lindsey, K., and M. M. Yeoman. 1983. The Relationship between Growth Rate, Differentiation and Alkaloid Accumulation in Cell Cultures. *Journal of Experimental Botany* 34: 1055-1065.
- Makkar, H. P. S., P. Siddhuraju, and K. Becker. 2007. Saponins *Plant Secondary Metabolites*. p 93-100. Humana Press, Totowa, NJ.
- Malmgren, S. 1996. Orchid propagation: theory and practice. In: *North American native orchids: propagation and production*. North American Native Terrestrial Orchid Conference, Germantown, Maryland. p 63-71.
- Manoi, F. 2008. Ant-plants (Myrmecodia) potential medicinal plant to cure diseases. *Warta Penelitian dan Pengembangan Tanaman Industri* 14: 26-30. [Indonesian].
- Miransari, M., and D. Smith. 2009. Rhizobial lipo-chitooligosaccharides and gibberellins enhance barley (*Hordeum vulgare* L.) seed germination. *Biotechnology* 8: 270-275.
- Mohan Reddy, Y., and K. Saritha. 2012. Callus induction and somatic embryogenesis of *Gardenia latifolia* Ait. *International Journal of current science* 4: 83-89.

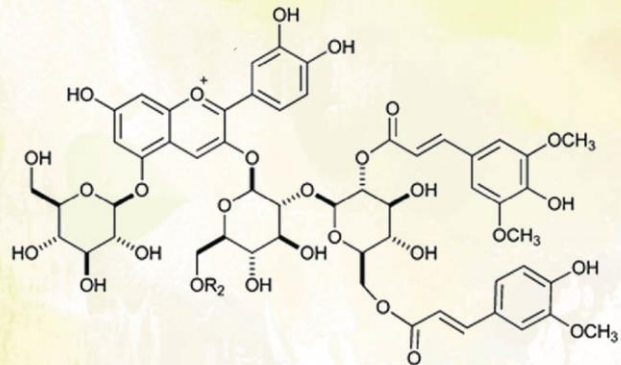
- Morini, S., C. D'Onofrio, G. Bellocchi, and M. Fisichella. 2000. Effect of 2,4-D and light quality on callus production and differentiation from in vitro cultured quince leaves. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 63: 47-55.
- Müller, K. et al. 2013. Demethylesterification of Cell Wall Pectins in Arabidopsis Plays a Role in Seed Germination. *Plant Physiology* 161: 305-316.
- Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Nagata, T., and I. Takebe. 1971. Plating of isolated tobacco mesophyll protoplasts on agar medium. *Planta* 99: 12-20.
- Paiva, M., and J. Janick. 1982. In vivo and in vitro production of alkaloids in *Theobroma cacao* l.
- Pal, R., K. Girhepunje, A. Upadhayay, and N. Thirumoorthy. 2012. Antioxidant and free radical scavenging activity of ethanolic extract of the root of *Morinda citrifolia* (Rubiaceae). *African journal of pharmacy and pharmacology* 6: 278-282.
- Perry, C. A., R. A. Leigh, A. D. Tomos, R. E. Wyse, and J. L. Hall. 1987. The regulation of turgor pressure during sucrose mobilisation and salt accumulation by excised storage-root tissue of red beet. *Planta* 170: 353-361.
- Phua, Q. Y. et al. 2016. The Callogenic Effects Of 2, 4-Dichlorophenoxy Acetic Acid (2, 4-D) On Leaf Explants Of Sabah Snake Grass (*Clinacanthus nutans*). *Pak. J. Bot* 48: 561-566.
- Prachayasittikul, S. et al. 2008. Antimicrobial and antioxidative activities of bioactive constituents from *Hydnophytum formicarum* Jack. *Molecules* 13: 904-921.
- Purnamaningsih, R. 2016. Induksi kalus dan optimasi regenerasi empat varietas padi melalui kultur in vitro. *Jurnal AgroBiogen* 2: 74-80.
- Radha, R. K., S. R. Shereena, K. Divya, P. N. Krishnan, and S. Seeni. 2011. In vitro propagation of *Rubia cordifolia* Linn. A medicinal plant of the western ghats. *International Journal of Botany* 7: 90-96.
- Robbiani, D., T. Nurhidayati, and N. Jadid. 2010. Pengaruh Kombinasi Naphthalene Acetic Acid dan Kinetin Pada Kultur In Vitro Ekslan Daun Tembakau (*Nicotiana tabacum* L.), Institut Teknologi Sepuluh November, Surabaya.
- Rout, G. R., S. Samantaray, and P. Das. 2000. In vitro somatic embryogenesis from callus cultures of *Cephaelis ipecacuanha* A. Richard. *Scientia Horticulturae* 86: 71-79.
- Sanjaya, R. E. et al. 2014. Investigation on supercritical CO₂ extraction of phenolic-phytochemicals from an epiphytic plant tuber (*Myrmecodia pendans*). *Journal of CO₂ Utilization* 6: 26-33.
- Sari, Y. P., W. Kustiawan, S. Sukartiningsih, and A. Ruchaemi. 2017. The potential of secondary metabolites of *Myrmecodia tuberosa* from different host trees. *Nusantara Bioscience* 9: 170-174.
- Sari, Y. P., and R. Kusuma. 2015. Modifikasi konsentrasi sukrosa pada media padat dan cair untuk pertumbuhan kalus tanaman sarang semut (*Myrmecodia tuberosa* jack.) secara in vitro. *Bio Wallacea Jurnal Ilmiah Ilmu Biologi* 1: 9-13.
- Shahnewaz, S., and M. Bari. 2004. Callus Induction and Plant Regeneration in Anther Culture of Rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Tissue Cult* 14: 37-43.
- Shi, D. 2014. Effects of culture media and plant growth regulators on micropropagation of Willow (*Salix matsudana* 'Golden Spiral) and Hazelnut (*Corylus colurna* 'Te Terra Red), University of Nebraska, Nebraska, USA.
- Soeksmanto, A., M. A. Subroto, H. Wijaya, and P. Simanjuntak. 2010. Anticancer activity test for extracts of sarang semut plant (*Myrmecodia pendens*) to HeLa and MCM-Ba cells. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 13: 148-151.
- Stella, A., and M. R. Braga. 2002. Callus and cell suspension cultures of *Rudgea jasminoides*, a tropical woody Rubiaceae. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 68: 271-276.

- Stobbe, H., U. Schmitt, D. Eckstein, and D. Dujesiefken. 2002. Developmental stages and fine structure of surface callus formed after debarking of living lime trees (*Tilia* sp.). *Annals of Botany* 89: 773-782.
- Subroto, M. A., and H. Saputro. 2008. Gempur penyakit dengan sarang semut. Penebar Swadaya, Jakarta.
- Sudiono, J., C. T. Oka, and P. Trisfilha. 2015. The Scientific Base of *Myrmecodia pendans* as Herbal Remedies.
- Supriatno, D. 2014. Antitumor activity of Papua's *Myrmecodia pendans* in human oral tongue squamous cell carcinoma cell line through induction of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 and suppression of cyclin E. *Journal of Cancer Research & Therapy* 2: 48-53.
- Tambe, N. M. 2013. Studies in in vitro callus culture of *Solanum khasianum* Clarke. *International Journal of Recent Trends in Science and Tecnology* 5: 111-112.
- Trejo-Tapia, G., A. Jimenez-Aparicio, M. Rodriguez-Monroy, A. De Jesus-Sanchez, and G. Gutierrez-Lopez. 2001. Influence of cobalt and other microelements on the production of betalains and the growth of suspension cultures of *Beta vulgaris*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 67: 19-23.
- Waes, J. v., and P. Debergh. 1986. In vitro germination of some Western European orchids. *Physiologia Plantarum* 67: 253-261.
- Welsh, J. R., and J. P. Moge. 1991. Dasar-dasar genetika dan pemuliaan tanaman. Erlangga.
- Zulfiqar, B., N. A. Abbasi, T. Ahmad, and I. A. Hafiz. 2009. Effect of explant sources and different concentrations of plant growth regulators on in vitro shoot proliferation and rooting of avocado (*Persea americana* Mill.) cv. "Fuerte". *Pak J Bot* 41: 2333-2346.

Potensi Sarang Semut sebagai bahan Fitofarmakokimia



Yanti Puspitasari
Chairul Saleh
Eko Kusumawati
Rudy Agung Nugroho



PRAKATA

Bidang farmakokimia telah menjadi hal penting akhir-akhir ini. Farmakokimia berkaitan dengan penemuan, desain, dan sintesis senyawa aktif biologis dan reaksi dalam makhluk hidup. Sayangnya bahan pembuatan atau bahan dasar farmakokimia dari bahan alam terus mengalami penurunan dalam jumlah, apalagi yang berasal dari tanaman langka. Sebagai alternatif, dengan metode kultur jaringan, tumbuhan seperti sarang semut dibudidayakan dan dimanfaatkan bahan aktifnya sebagai fitofarmakokimia.

Buku ini memaparkan tentang potensi tumbuhan sarang semut (*Mymecodia tuberosa*) sebagai bahan dasar fitofarmakokimia yang memiliki antioksidan yang tinggi yang telah terbukti bersifat sebagai anti kanker dan juga bermanfaat sebagai agensia biologi seperti antibakteri, antivirus, anti fungal dan masih banyak lagi.

Untuk membagi informasi tentang senyawa-senyawa aktif dari tumbuhan sarang semut dan potensinya sebagai sumber fitofarmakokimia ini, buku tentang “potensi sarang semut sebagai bahan fitofarmakokimia” ini ditulis. Buku ini disusun sebagai bahan pengetahuan untuk menambah wawasan tentang potensi sarang semut dan bahan aktif yang terkandung. Buku ini diperuntukkan bagi mahasiswa maupun pengajar yang melakukan penelitian yang berhubungan dengan tumbuhan sarang semut serta teknik kultur jaringan dan beberapa aspek kimiawi serta mikrobiologi.

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada pemerintah Indonesia melalui KEMENRISTEK DIKTI (melalui dana hibah penelitian unggulan perguruan tinggi / pupt) no. 359/un17.41/kl/2017. Tak lupa penulis mengucapkan terima kasih kepada berbagai pihak yang telah membantu dalam pembuatan buku dan proses editing. Buku ini tentu saja jauh dari kata sempurna, untuk itu kritik dan saran yang membangun dari pembaca sangat dibutuhkan untuk perbaikan ke depan. Akhir kata, selamat membaca dan semoga berguna.

Samarinda, Oktober 2017

Penulis

DAFTAR ISI

	Hal
PRAKATA	ii
DAFTAR ISI	iii
DAFTAR GAMBAR	iv
DAFTAR TABEL	v
BAB1 Mengenal tumbuhan sarang semut	1
1.1 Gambaran Umum	1
1.2 Potensi sarang semut	2
BAB 2 Taksonomi tumbuhan sarang semut.....	4
2.1 Taksonomi.....	4
2.2 Morfologi	5
BAB 3 Penyebaran tumbuhan sarang semut	7
3.1 Penyebaran sarang semut	7
3.2 Tanaman inang	8
BAB 4 Kandungan metabolit sekunder	10
4.1 Kandungan metabolit sekunder tumbuhan sarang semut	10
4.2 Definisi dan Klasifikasi Senyawa Fenolik dan Flavonoid	13
4.3 Sumber dan Aktivitas Senyawa Fenolik dan Flavonoid.....	14
4.4 Biosintesis Senyawa Fenolik dan Flavonoid.....	15
4.5 Pemisahan, Pemurnian dan Elusidasi Senyawa Fenolik dan Flavonoid.....	16
4.6 Teknik Ekstraksi	19
4.7 Teknik Isolasi dan Purifikasi Senyawa Metabolit Sekunder	20
BAB 5 Potensi Antimikrobia	21
5.1 Bakteri	21
5.2 Antibakteri	28
5.3 Uji antibakteriekstrak kalus tanaman sarang semut.....	30
5.4 Daya hambat.....	32
BAB 6 Prospek budidaya sarang semut secara <i>in vitro</i>	40
6.1 Kendala budidaya sarang semut.....	40
6.2 Teknik kultur jaringan	41
6.3 Kalus sebagai sumber metabolit sekunder secara <i>in vitro</i>	44
Daftar Referensi.....	47

DAFTAR GAMBAR

	Hal
Gambar 1. Tumbuhan Sarang Semut (<i>Myrmecodi tuberosa</i> Jack)	2
Gambar 2. Tumbuhan Sarang Semut a). Batang dan b). Labirin di dalam Umbi.....	6
Gambar 3. Bagian Generatif Tumbuhan Sarang Semut (a) Bunga, (b) Buah, (c) Biji.....	6
Gambar 4. Sketsa distribusi geografi tumbuhan sarang semut	7
Gambar 5. Beberapa jenis pohon inang sebagai tempat menempelnya tumbuhan sarang semut. (a) pohon rambutan, (b) pohon cempedak, (c) pohon cemara.....	8
Gambar 6. Letak Tumbuhan Sarang Semut pada Inang. (a) Tumbuhan Sarang Semut Menempel pada Batang Inang, (b) Tumbuhan Sarang Semut Menempel pada Ranting Inang dengan Posisi Menggantung	9
Gambar 7. Struktur dari fenol sederhana.....	13
Gambar 8. Struktur dasar kerangka flavonoid	14
Gambar 9. Enam kelas flavonoid secara umum dijumpai dalam makanan	15
Gambar 10. Aktivitas dari teh hijau	15
Gambar 11. Biosintesis dari Flavonoid	16
Gambar 12. Analisis LC-UV-MS dari ekstrak metanol	17
Gambar 13. Zona Hambat Pengaruh Ekstrak Kalus Sarang Semut (<i>M. tuberosa</i> Jack.) terhadap bakteri <i>S. Aureus</i>	38
Gambar 14. Zona Hambat Pengaruh Ekstrak Kalus Sarang Semut (<i>M. tuberosa</i> Jack.) terhadap bakteri <i>S. Typhi</i>	38
Gambar 15. Budidaya tanaman sarang semut (<i>M. tuberosa</i>) secara in vitro dengan berbagai sumber eksplan (a) batang (b) nodus (c) kotiledon (d) umbi (e) akar (f,g) perakaran sarang semut (h) aklimatisasi sarang semut	44
Gambar 16. Kalus Tanaman Sarang Semut (<i>M. tuberosa</i>) pada a. media MS Padat	46
b. media MS Cair	46

DAFTAR TABEL

	Hal
Tabel 1. Berbagai Spesies dari Tumbuhan Sarang Semut (<i>Myrmecodia</i>)	4
Tabel 2. Komposisi dan Kandungan Aktif Tumbuhan Sarang Semut.....	10
Tabel 3. Klasifikasi Fenolik.....	13
Tabel 4. Preparatif Pemisahan Flavonoid dengan HPLC.....	18
Tabel 5. Nilai LC ₅₀ (ppm) Ekstrak Etanol Kalus Sarang Semut (<i>M. tuberosa</i> Jack.) terhadap <i>A. salina</i> Leach. menggunakan pelarut air laut.....	35
Tabel 6. Rata-Rata Diameter Zona Bening Perlakuan Ekstrak Etanol Kalus Sarang Semut (<i>Myrmecodia tuberosa</i> Jack) terhadap Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> dan <i>Salmonella typhi</i>	37

BAB 1 Mengenal Tumbuhan Sarang Semut

1.1 Gambaran umum

Sarang semut merupakan tumbuhan dari suku Hydnophytinae (Rubiaceae). Tumbuhan ini bersifat epifit, artinya menempel pada tumbuhan lain, tidak hidup secara parasit pada inangnya tetapi hanya memanfaatkannya untuk menempel. Tumbuhan sarang semut membentuk suatu hubungan simbiosis dengan semut dan cendawan. Tumbuhan ini menyediakan habitat untuk koloni semut, seperti kanopi hutan yang tinggi dan melindungi semut dari para pemangsa melalui duri-duri tajamnya. Labirin dalam umbi dengan lubang masuk internal, menyediakan rumah di atas tanah untuk koloni semut. Bangsa semut pun membantu tumbuhan itu untuk menyediakan pertahanan dan tidak mau merusak jaringan pohon yang merupakan rumahnya. Semut juga menyediakan nutrisi untuk tumbuhan dengan meninggalkan sisa-sisa makanan di terowongan di dalam umbi. Kelenjar-kelenjar khusus di sepanjang terowongan kemudian menyerap nutrisi yang ditinggalkan semut tadi untuk pertumbuhan tanaman.

Hubungan simbiosis ini membuat tumbuhan mendapatkan gizi dengan efektif melalui peran semut, lebih banyak dari kemampuan akar untuk mencari makanan. Di hutan di mana terdapat banyak tumbuhan ini, hanya ada satu jenis semut untuk satu tanaman. Tidak ada satu tumbuhan sarang semut dihuni oleh lebih dari 1 jenis semut. Sejauh ini, hanya tiga jenis semut yang mau tinggal di dalam batang tumbuhan ini, yang berasal dari genus *Iridomyrmex*. Manoi (2008) menyatakan bahwa Pusat Penelitian dan Pengembangan Zoologi mengidentifikasi semut tersebut sebagai *Ochetellus* sp. Satu tumbuhan sarang semut dihuni oleh satu jenis semut. Semut merasa nyaman tinggal di dalam umbi sarang semut karena tumbuhan tersebut dapat mempertahankan perubahan suhu 2-3°C. Selain simbiosis dengan semut tumbuhan sarang semut juga bersimbiosis dengan jamur. Huxley (1978) mengidentifikasi jenis jamur yang bersimbiosis pada *Myrmecodia* dan *Hydnophytum* adalah *Arthrocladium* spp.



Gambar 1. Tumbuhan sarang semut (*Myrmecodia tuberosa* Jack)

1.2 Potensi sarang semut

Tumbuhan sarang semut (*Myrmecodia tuberosa* Jack) merupakan tumbuhan asli Indonesia yang secara tradisional telah lama digunakan oleh penduduk asli untuk mengobati berbagai penyakit. Berdasarkan hasil penelitian modern didapati bahwa tumbuhan sarang semut mengandung senyawa aktif penting seperti flavonoid, tanin, tokoferol, fenolik dan kaya berbagai mineral yang sangat berguna sebagai antioksidan dan anti kanker (Hendra, 2008).

Dalam uji *in vitro*, terbukti bahwa sarang semut ampuh menghambat pertumbuhan sel kanker. Peneliti Gui Kim Tran, Yasuhiro Tezuka, Yuko Harimaya, dan Arjun menyatakan bahwa ekstrak sarang semut bersifat antiproliferasi terhadap 3 jenis kanker yaitu kanker serviks, kanker paru dan kanker usus (Manoi, 2008). Soeksmanto dkk. (2010) juga telah melakukan penelitian dan menyatakan bahwa ekstrak tumbuhan sarang semut (*M. pendens*) dapat menghalangi pertumbuhan sel kanker servik dan payudara (HeLa dan MCM-B2 cells). Jenis *Hydnophytum formicarum* mempunyai total fenolik dan antioxidant activity (AOA) yang tinggi. *H. formicarum* dapat berfungsi sebagai anti oksidan dan anti mikroba.

Selain dapat mengobati kanker dan tumor, baik yang jinak atau ganas seperti: kanker otak, kanker payudara, kanker hidung, kanker paru-paru, kanker lever, kanker rahim, kanker usus, kanker kulit, dan kanker darah (leukemia), tumbuhan sarang semut juga dapat mengobati dan

gangguan jantung koroner, stroke, wasir (ambeien), benjolan dalam payudara, gangguan fungsi ginjal dan prostat, haid dan keputihan, melancarkan peredaran darah, migren (sakit kepala sebelah), penyakit paru-paru (TBC), rematik (encok), alergi hidung dan mimisan, maag, asam urat, sakit tulang, pegal-pegal, nyeri otot. Selain dapat menyembuhkan penyakit tersebut di atas, sarang semut terbukti pula dapat digunakan untuk melancarkan dan meningkatkan air susu ibu (ASI), mempercepat proses pemulihan kesehatan setelah melahirkan, memulihkan kewanitaan (sari rapet), memulihkan kesegaran dan stamina.

BAB 2 Taksonomi dan Morfologi Tumbuhan Sarang Semut

2.1. Taksonomi

Klasifikasi tumbuhan sarang semut menurut Lemmens dan Bunyapraphatsara (2003) adalah sebagai berikut:

kingdom : Plantae
divisi : Spermatophyta
kelas : Dicotyledonae
ordo : Rubiales
famili : Rubiaceae
genus : *Myrmecodia*
spesies : *Myrmecodia tuberosa* Jack.

Kajian taksonomi tumbuhan sarang semut telah dilakukan sejak beberapa abad yang lalu. Penelitian pertama kali dilakukan oleh peneliti Belanda Georg Rumphius pada tahun 1750. Setelah itu, banyak peneliti yang melanjutkannya dan telah banyak terjadi revisi yang akhirnya disempurnakan oleh C. R. Huxley dan M. H. P. Jebb pada tahun 1993.

Tumbuhan sarang semut terdiri dari 5 genus yaitu *Hydnophytum*, *Myrmecodia*, *Anthorrhiza* (di daratan Papua Nugini), *Myrmephytum* (di daratan Papua Nugini dan Filipina) dan *Squamellaria* (merupakan tanaman lokal di Pulau Fiji), namun yang paling dekat berasosiasi dengan semut hanya genus *Hydnophytum* dan *Myrmecodia*. Genus *Hydnophytum* terdiri dari 45 spesies sedangkan *Myrmecodia* memiliki 26 spesies. Hingga tahun 1993 tercatat ada 26 spesies tumbuhan sarang semut dari genus *Myrmecodia* dan sebanyak 16 sub spesies atau varietas dari spesies *M. tuberosa*. Semua spesies dari kedua genus ini memiliki batang yang menggelembung dan berongga-rongga. Namun dari sekian banyak spesies dari kedua genus tersebut, hanya jenis *H. formicarum*, *M. tuberosa*, *M. pendens* yang digunakan sebagai obat (Soeksmanto dkk., 2010).

Tabel 1. Berbagai Spesies dari Tumbuhan Sarang Semut (*Myrmecodia*)

No	Nama spesies	No	Nama spesies
1	<i>M. tuberosa</i> Jack	14	<i>M. angustifolia</i> Valetton
2	<i>M. kutubuensis</i> Huxley & Jebb	15	<i>M. sterrophylla</i> Merr. & Perry
3	<i>M. jobiensis</i> Becc.	16	<i>M. oksapmiminensis</i> Huxley & Jebb
4	<i>M. erinacea</i> Becc.	17	<i>M. paradoxa</i> Huxley & Jebb
5	<i>M. alata</i> Becc.	18	<i>M. aureospina</i> Huxley & Jebb
6	<i>M. beccarii</i> J.D. Hooker	19	<i>M. brassii</i> Merr. & Perry
7	<i>M. platytyrea</i> Becc.	20	<i>M. lamii</i> Merr. & Perry
8	<i>M. pendens</i> Merr. & Perry	21	<i>M. archboldiana</i> Merr. & Perry
9	<i>M. longissima</i> Valetton	22	<i>M. pteroaspida</i> Huxley & Jebb
10	<i>M. oblongata</i> Valetton	23	<i>M. melanacantha</i> Huxley & Jebb
11	<i>M. longifolia</i> Valetton	24	<i>M. horrida</i> Huxley & Jebb
12	<i>M. schlechteri</i> Valetton	25	<i>M. ferox</i> Huxley & Jebb
13	<i>M. albertisii</i> Becc.	26	<i>M. gracilispina</i> Huxley & Jebb

2.2 Morfologi

Menurut Huxley and Jebb's (1993), struktur morfologi tumbuhan sarang semut terdiri atas:

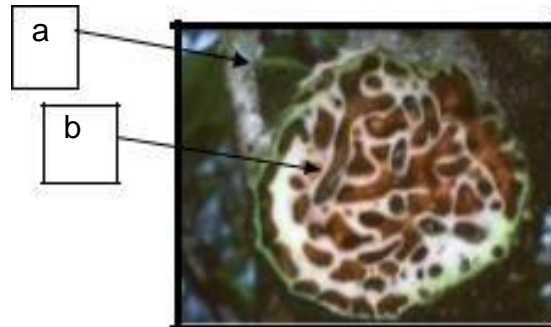
a. Umbi

Umbi pada tumbuhan sarang semut umumnya berbentuk bulat saat muda, kemudian menjadi lonjong memendek atau memanjang setelah tua. Pada jenis *Myrmecodia tuberosa* umbinya hampir selalu berduri yang berfungsi untuk melindungi diri dari pemangsa herbivora, sedangkan jenis *Hydnophyptum formicarum* umbinya memiliki suatu sistem jaringan lubang-lubang yang berbentuk serta interkoneksi dari lubang-lubang tersebut sangat khas sehingga digunakan untuk mengembangkan sistem klasifikasi dari genus ini. Umbi pada tumbuhan sarang semut menghasilkan kadar gula yang sangat tinggi sebesar 85% sehingga dapat berfungsi sebagai sumber pakan bagi semut. Bagian umbi (caudex) dari tumbuhan sarang semut akan menggelembung seiring bertambahnya umur. Umbi sarang semut ini ada yang berbobot 0,5-5 kg.

b. Batang

Tumbuhan sarang semut biasanya hanya memiliki satu atau beberapa cabang. Batangnya jarang ada yang bercabang. Bahkan, pada beberapa

spesies tidak bercabang sama sekali. Batangnya tebal dan internodalnya sangat dekat, kecuali pada pangkal sarang semut dari beberapa spesies. Visualisasi contoh umbi dan batang tersebut dapat dilihat pada gambar berikut:



Gambar 2. Tumbuhan Sarang Semut a). Batang dan b). Labirin di dalam Umbi

c. Daun

Daun sarang semut tebal seperti kulit. Pada beberapa spesies memiliki daun yang sempit dan panjang. Stipula (penumpu) besar dan berlawanan arah dengan tangkai daun (petiolus).

d. Bunga

Pembungaan tumbuhan sarang semut mulai terjadi saat tumbuhan sudah dewasa (beberapa ruas sudah terbentuk). Bunga muncul pada setiap nodus (buku) yang berkembang pada suatu kantong (alveolus) yang berbeda. Alveolus tersebut memiliki ukuran yang tidak sama dan terletak pada tempat yang berbeda pada batang. Kuntum bunga muncul pada dasar alveoli. Kelopak bunga biasanya terbelah pada bagian ujung. Buah berkembang dalam cekungan dan menonjol keluar setelah masak. Bunga, buah dan bijinya dapat dilihat pada gambar berikut.



(a)



(b)



(c)

Gambar 3. Bagian Generatif Tumbuhan Sarang Semut (a) Bunga, (b) Buah, (c) Biji.

BAB 3 Penyebaran Tumbuhan Sarang Semut

3.1 Penyebaran sarang semut

Penyebaran sarang semut mulai dari Semenanjung Malaysia hingga Filipina, Kamboja, Sumatera, Kalimantan, Jawa, Papua, Papua Nugini, Cape York hingga Kepulauan Solomon. Di Provinsi Papua, tumbuhan sarang semut dapat dijumpai terutama di daerah Pegunungan Tengah, yaitu di hutan belantara Kabupaten Jayawijaya, Kabupaten Tolikara, Kabupaten Puncak Jaya, Kabupaten Pegunungan Bintang dan Kabupaten Paniai. Keanekaragaman terbesar dari sarang semut ditemukan di pulau Papua, di mana spesies dataran tingginya adalah lokal spesifik

Penyebaran dari tumbuhan sarang semut berbeda-beda tergantung dari jenisnya. Untuk kelompok *Myrmecodia* sp. penyebarannya banyak ditemukan mulai dari semenanjung Malaysia hingga Filipina, kamboja, Sumatera, Kalimantan, Jawa, Papua, Papua New Guinea, Cape York hingga kepulauan Solomon yang umumnya beriklim tropis. Di Australia terdapat jenis endemik yaitu *Myrmecodia beccarii*. Jenis tersebut hanya ditemukan di Utara Australia seperti daerah Cookwan, Endeavour, dan East of Igham.



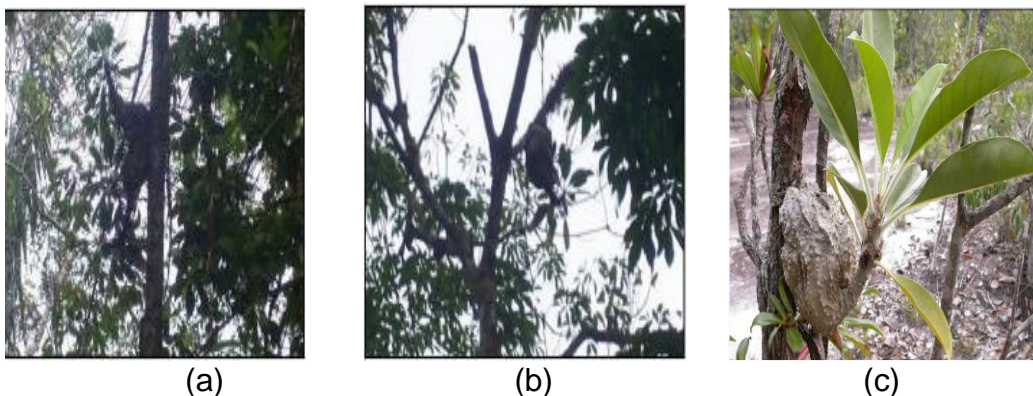
Gambar 3.1. = distribusi geografi tumbuhan sarang semut.

Secara ekologi tumbuhan sarang semut hidup tersebar di hutan bakau dan pohon-pohon di pinggir pantai hingga ketinggian 2400 meter di atas permukaan laut (m dpl). Tumbuhan sarang semut paling banyak ditemukan di padang rumput,

hutan dan daerah pertanian terbuka dengan ketinggian 600 mdpl dan jarang ditemukan di hutan tropis dataran rendah.

3.2 Tanaman Inang

Tumbuhan sarang semut menempel pada tumbuhan lain, tetapi tidak menjadi parasit bagi tumbuhan yang dijadikan tempat tumbuhnya (epifit). Tumbuhan sarang semut jarang menempel pada pohon-pohon dengan batang halus dan rapuh seperti *Eucalyptus*, namun banyak dijumpai menempel pada pohon yang memiliki batang yang keras dan kayunya biasanya digunakan untuk bahan bangunan. Tumbuhan sarang semut di Papua banyak ditemukan menempel di beberapa pohon umumnya di pohon kayu putih (*Melaleuca leucadendron*), kaha (*Castonopsis* sp.) dan pohon beech (*Nothofagus*). Kawasan hutan lindung Loksado di Pegunungan Meratus, Kalimantan Selatan terdapat beberapa jenis pohon inang yang ditemukan yaitu pohon asam (*Tamarindus indica*), pohon bayuan, pohon bijai, pohon cangkring (*Erythrina Verigata*), pohon gala-gala (*Sesbania grandiflora*), pohon gintungan (*Bischofia javanica*), pohon hambawang (*Mengifera odorata*), pohon jalamo, pohon karet (*Ficus elastica*), pohon kasturi (*Abelmoschus moschatus*), pohon kemiri (*Aleurites moluccana*), pohon merumbang, pohon mikumbang, pohon rambutan (*Nephelium* sp.) dan pohon cempedak (*Artocarpus champeden*). Sedangkan di Kabupaten Nias, Provinsi Sumatra Utara, tumbuhan sarang semut umumnya menempel pada pohon cemara (*Casuarina junghuniana*).



Gambar 5. Beberapa jenis pohon inang sebagai tempat menempelnya tumbuhan sarang semut. (a) pohon rambutan, (b) pohon cempedak, (c) pohon cemara.

Tumbuhan sarang semut pada pohon inang ditemukan ada yang menempel pada batang, percabangan batang (ranting) ada pula yang menggantung dengan menggunakan akarnya, seperti terlihat pada gambar.



(a)

(b)

Gambar 6. Letak Tumbuhan Sarang Semut pada Inang. (a) Tumbuhan Sarang Semut Menempel pada Batang Inang, (b) Tumbuhan Sarang Semut Menempel pada Ranting Inang dengan Posisi Menggantung.

BAB 4 Kandungan Metabolit Sekunder

4.1 Metabolit sekunder

Senyawa yang tidak diperlukan bagi pertumbuhan dan perkembangan normal melalui lintasan metabolik yang umum bagi semua tumbuhan kadang disebut sebagai senyawa sekunder atau produk sekunder. Ini membedakannya dengan senyawa primer seperti gula fosfat, asam amino dan amida, protein, nukleotida, asam nukleat, klorofil dan senyawa organik yang semuanya diperlukan untuk kelangsungan hidup semua tumbuhan.

Sebagian besar tumbuhan penghasil senyawa metabolit sekunder memanfaatkan senyawa tersebut untuk mempertahankan diri dan berkompetisi dengan makhluk hidup lain di sekitarnya. Tumbuhan dapat menghasilkan metabolit sekunder (seperti: quinon, flavonoid, tanin, dll) yang membuat tanaman lain tidak dapat tumbuh di sekitarnya. Hal ini disebut sebagai alelopati. Berbagai senyawa metabolit sekunder telah digunakan sebagai obat atau model untuk membuat obat baru, contohnya adalah aspirin yang dibuat berdasarkan asam salisilat yang secara alami terdapat pada tumbuhan tertentu. Manfaat lain dari metabolit sekunder adalah sebagai pestisida dan insektisida, contohnya adalah rotenon dan rotenoid. Beberapa metabolit sekunder lainnya yang telah digunakan dalam memproduksi sabun, parfum, minyak herbal, pewarna, permen karet dan plastik alami adalah resin, antosianin, tanin dan saponin.

Komposisi dan kandungan senyawa aktif yang terdapat pada tumbuhan sarang semut dapat dilihat pada Tabel 2 sebagai berikut:

Tabel 2. Komposisi dan Kandungan Aktif Tumbuhan Sarang Semut

No	Parameter	Satuan	Nilai
1	Energi	Kkal/100 g	350,52
2	Kadar air	g/ 100 g	4,54
3	Kadar abu	g/100 g	11,13
4	Kadar lemak	g/ 100 g	2,64
5	Kadar protein	g/100 g	2,75
6	Kadar karbohidrat	g/100 g	78,94
7	Tokoferol	mg/100 g	31,34
8	Total fenol	g/100 g	0,25
9	Kalsium (Ca)	g/100 g	0,37
10	Natrium (Na)	mg/100 g	68,58
11	Kalium (K)	g/100 g	3,61

No	Parameter	Satuan	Nilai
12	Seng (Zn)	mg/100 g	1,36
13	Besi (Fe)	mg/100 g	29,24
14	Fosfor (P)	g/100 g	0,99
15	Magnesium (Mg)	g/100 g	1,50

Analisis kimia dari tumbuhan sarang semut menunjukkan bahwa tumbuhan ini mengandung senyawa-senyawa kimia dari golongan flavonoid dan tanin). Sari, dkk (2017) menyatakan bahwa tumbuhan sarang semut *Myrmecodia tuberosa* pada bagian daun, umbi dan daun mengandung fenolik, flavonoid, alkaloid, saponin dan steroid. Kandungan senyawa metabolit pada daun jauh lebih tinggi dibandingkan dengan bagian lain.

Flavonoid merupakan golongan senyawa bahan alam dari senyawa fenolik yang banyak merupakan pigmen tumbuhan. Fungsi kebanyakan flavonoid dalam tubuh manusia adalah sebagai antioksidan, sehingga sangat baik untuk pencegahan kanker. Penelitian-penelitian mutakhir telah mengungkapkan fungsi lain dari flavonoid, tidak saja untuk pencegahan, tetapi juga untuk pengobatan kanker. Mekanisme kerja flavonoid lainnya adalah inaktivasi karsinogen, antiproliferasi penghambatan siklus sel, induksi apoptosis, diferensiasi, inhibisi angiogenesis serta pembalikan resistensi multi obat ataupun kombinasi dari mekanisme-mekanisme tersebut (Manoi, 2008).

Manfaat flavonoid lainnya adalah untuk melindungi struktur sel, memiliki hubungan sinergis dengan vitamin C (meningkatkan efektivitas vitamin C), antiinflamasi, mencegah tulang keropos, dan sebagai antibiotik. Flavonoid dapat berperan secara langsung sebagai antibiotik dengan mengganggu fungsi dari mikroorganisme seperti bakteri atau virus. Fungsi flavonoid sebagai antivirus telah banyak dipublikasikan, termasuk untuk virus HIV (AIDS) dan virus herpes. Selain itu, flavonoid juga berperan dalam pencegahan dan pengobatan beberapa penyakit lain seperti asma, katarak, diabetes, encok/rematik, migren, wasir, dan periodontitis (radang jaringan ikat penyangga akar gigi).

Tanin merupakan astringen, polifenol tanaman berasa pahit yang dapat mengikat dan mengendapkan protein. Umumnya tanin digunakan untuk aplikasi di bidang pengobatan, misalnya untuk pengobatan diare, hemostatik (menghentikan pendarahan), dan wasir. Kemampuan sarang semut secara empiris untuk

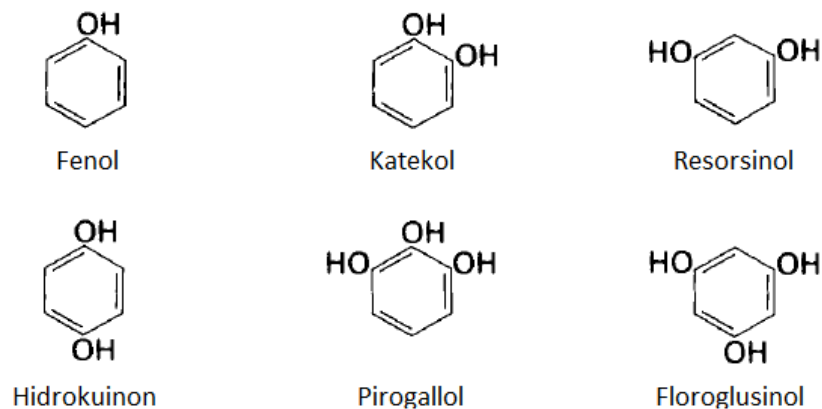
pengobatan ambeien (wasir) dan mimisan diduga kuat berkaitan dengan kandungan taninnya. Alkaloid memiliki keaktifan farmakologi tertentu, ada yang bersifat racun bagi manusia tetapi banyak juga yang digunakan dalam bidang pengobatan, seperti untuk menaikkan tekanan darah, mengurangi rasa sakit dan dapat melawan infeksi mikrobia.

Tumbuhan sarang semut juga mengandung tokoferol. Tokoferol berfungsi sebagai anti oksidan dan anti kanker. Tokoferol juga menangkal serangan radikal bebas dengan cara anti degeneratif. Senyawa kaya vitamin E ini mempunyai manfaat sebagai anti penuaan. Bila manusia mengkonsumsi banyak lemak dan radikal bebas, dengan adanya tokoferol akan bisa diatasi karena peran vitamin E bagi kesehatan amat vital. Vitamin E mencegah asam lemak tak jenuh, komponen sel membran dari oksidasi oleh radikal bebas (Manoi, 2008).

Dominika dan Dewi pada tahun 2008 telah melaporkan aktivitas antioksidan ekstrak fenol umbi Sarang Semut. Aktivitas antioksidan menunjukkan IC_{50} 73,48 ppm. Crisnangingtyas dan Rachmadi (2010) melaporkan pemanfaatan Sarang Semut (*Myrmecodia pendens*) sebagai antibakteri untuk bakteri gram positif dan gram negatif. Mardany dkk, (2016) melaporkan skrining fitokimia dan uji aktivitas sitotoksik dari tumbuhan Sarang Semut dari Kabupaten Merauke. Hasil skrining fitokimia menunjukkan tumbuhan Sarang Semut mengandung flavonoid dalam jumlah banyak disusul dengan saponin dan tanin dalam jumlah sedang uji aktivitas sitotoksik dari ekstrak metanol menunjukkan LC_{50} 22.86 ppm. Ariani dkk, (2014) melaporkan hasil uji skrining dan aktivitas antioksidan tumbuhan Sarang Semut. Hasil uji fitokimia ditunjukkan dalam Tabel sedangkan uji aktivitas antioksidan paling tinggi dengan perebusan 30 menit dengan IC_{50} sebesar 30,3 ppm.

4.2 Definisi dan Klasifikasi Senyawa Fenolik dan Flavonoid

Senyawa fenolik atau polifenol dapat didefinisikan sebagai senyawa kimia yang memiliki cincin aromatik dengan substituen hidroksil termasuk turunannya seperti ester, metil ester, glikosida dan lain-lain. Senyawa fenolik dapat mempunyai dua atau lebih gugus hidroksil (Gambar 7).



Gambar 7. Struktur dari fenol sederhana

Beberapa kelas dari polifenol seperti tanin terkondensasi mempunyai banyak gugus katekol dan floroglusinol dalam strukturnya. Klasifikasi dari fenolik dapat dilihat pada Tabel 3 (Harborne, 1989).

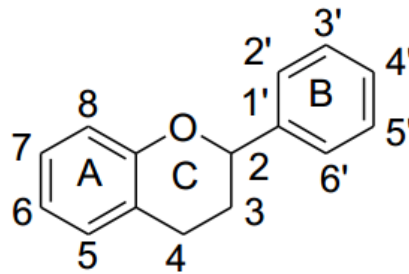
Tabel 3. Klasifikasi Fenolik

Jumlah Atom Karbon	Kerangka Dasar	Kelas	Contoh
6	C ₆	Fenol sederhana Benzokuinon	Katekol, hidrokuinon 2,6-Dimetoksibenzokuinon
7	C ₆ -C ₁	Asam fenolat	<i>p</i> -Hidroksibenzoat, salisilat
8	C ₆ -C ₂	Asetofenon Asam fenilasetat	3-Asetil-6-metoksibenzaldehida <i>p</i> -Hidroksifenilasetat
9	C ₆ -C ₃	Asam hidroksisinat Fenilpropena Kumarin Isokumarin Kromon	Kafeat, ferulat Miristisin, eugenol Umbelliferon, aeskuletin Bergenin Eugenin
10	C ₆ -C ₄	Nafhokuinon	Juglon, plumbagin
13	C ₆ -C ₁ -C ₆	Ksanthon	Mangiferin
14	C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilben Anthraquinon	Asam Lunularat Emodin
15	C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoid Isoflavanoid	Kuersetin, Sianidin Genistein
18	(C ₆ -C ₃) ₂	Lignan Neolignan	Pinoresinol Eusiderin
30	(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂	Biflavonoid	Amentoflavon
N	(C ₆ -C ₃) _n (C ₆) ₆ (C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	Lignin Katekol melanin Flavolan (tannin terkondensasi)	

Flavonoid adalah senyawa beranggotakan 15 karbon (C₁₅) berstruktur C₆-C₃-C₆ dan dibagi dalam tiga kelas besar bergantung kepada koneksi tiga karbon (C₃) terhadap dua cincin benzena. Ketiga kelas tersebut adalah 1,3-diarilpropana

(kerangka flavonoid), 1,2-diarilpropana (kerangka isoflavonoid) dan 1,1-diarilpropana (kerangka neoflavonoid).

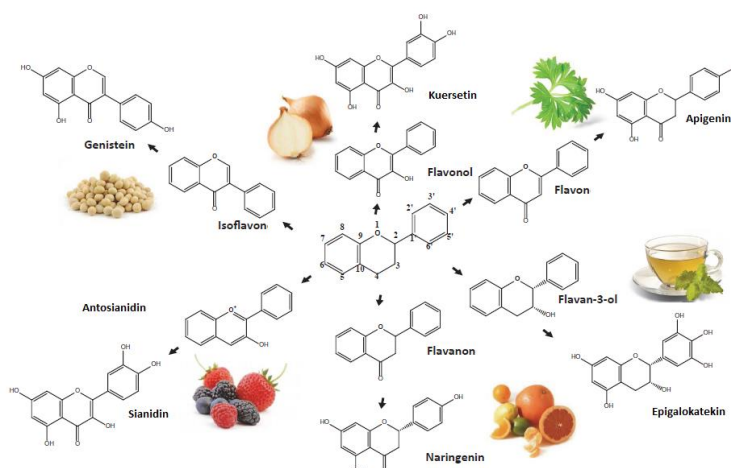
Flavonoid tersebar luas dalam polifenol tumbuhan dan ditemukan dalam jaringan tumbuhan yang berbeda seperti bunga, buah, akar, batang dan daun. Lebih dari 8000 flavonoid telah berhasil diidentifikasi. Flavonoid terjadi sebagai glikosida dan turunan termetilasi sebagai aglikon flavonoid bebas dalam tumbuhan (Sarma, 2009). Struktur dasar inti flavonoid adalah sebagai berikut:



Gambar 8. Struktur dasar kerangka flavonoid

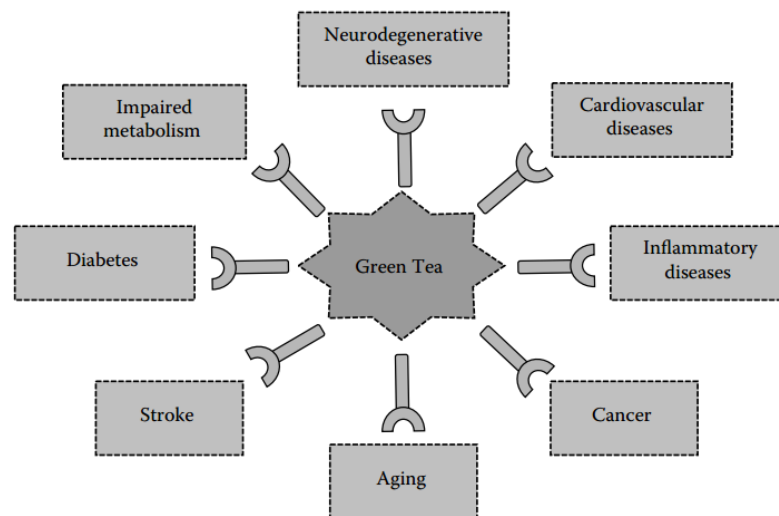
4.3 Sumber dan Aktivitas Senyawa Fenolik dan Flavonoid

Flavanon adalah kelas dari flavonoid yang banyak dijumpai dalam buah jeruk, walaupun sejumlah kecil juga terdapat di dalam anggur merah, dan tomat. Flavanon secara luas dikonsumsi di negara-negara barat. Dalam populasi remaja Spanyol mengkonsumsi 50 mg/hari atau sekitar 17% dari flavonoid total. Konsumsi flavanon sekitar 14,4; 20,4; 22; 33,5; dan 34,7 mg/hari juga dilaporkan di Amerika Serikat, Inggris, Finlandia, Yunani, dan Itali. Konsumsi dari buah jeruk atau jus akan mengurangi resiko stroke dan koroner mata akut. Gambar 9 menunjukkan distribusi dari enam kelas flavonoid (Rothwell dkk, 2012).



Gambar 9. Enam kelas flavonoid secara umum dijumpai dalam makanan

Polifenol ditemukan dalam berbagai sayuran, anggur merah, teh hitam dan teh hijau. Flavan-3-ol kadang disebut katekin berjumlah 30-40% dari berat kering daun teh hijau. Teh hijau (*Camellia sinensis*) termasuk dalam famili Theacease dan banyak mempunyai aktivitas (Weinreb *et al.*, 2012) seperti Gambar 10 berikut:

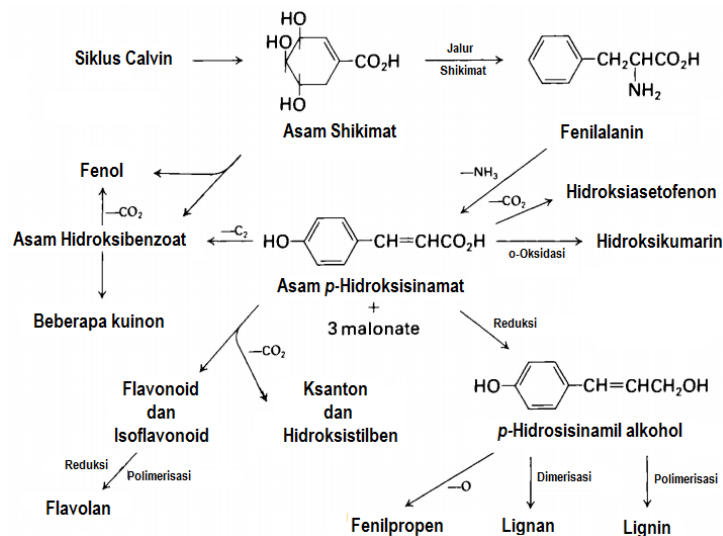


Gambar 10. Aktivitas dari teh hijau

4.4 Biosintesis Senyawa Fenolik dan Flavonoid

Dua kunci prekursor biosintesis flavonoid adalah fenilalanin diturunkan dari jalur shikimat dan malonil-CoA diperoleh dari sitrat yang dihasilkan oleh siklus asam trikarboksilat. Fenilalanin dikonversi menjadi 4-kumaroil-CoA melalui aksi beberapa enzim seperti PAL (fenilalanin amonia liase), C4H (sinamat 4-hidroksilase) dan 4CL (4-kumarat-CoA ligase). Prekursor pertama dalam biosintesis semua flavonoid adalah naringenin khalkon, dibentuk dari kondensasi dan siklisasi intermolekuler selanjutnya dari tiga molekul malonil-CoA dengan satu

ester asam hidrosisinamat-CoA (HCA-CoA), biasanya 4-kumaroil-CoA dikatalisis oleh enzim CHS (*khalkon sintase*).



Gambar 11. Biosintesis dari Flavonoid

4.5 Pemisahan, Pemurnian dan Elusidasi Senyawa Fenolik dan Flavonoid

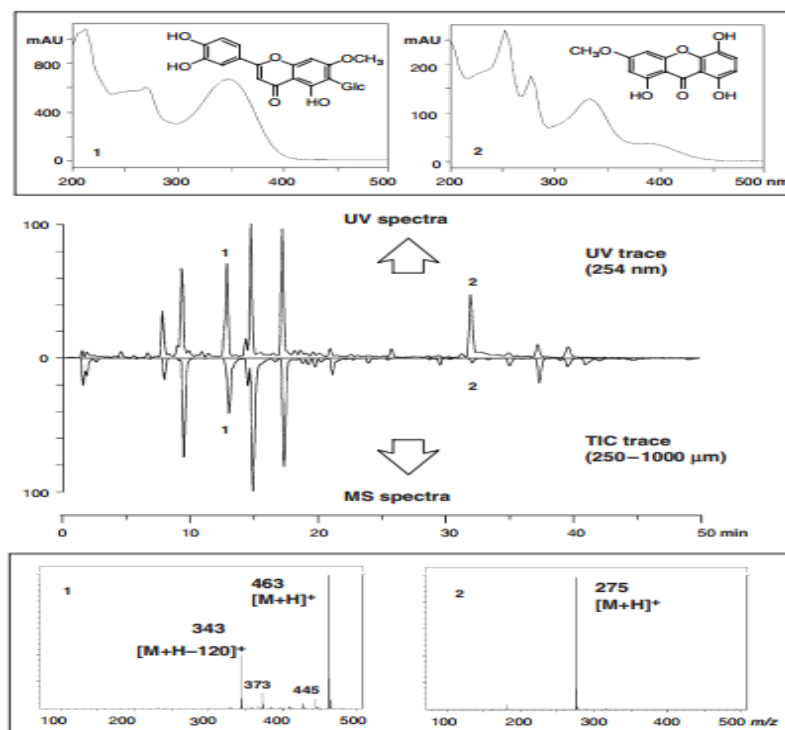
Dalam periode klasik untuk memisahkan fraksi fenolik dari ekstrak tumbuhan salah satunya dengan pengendapan menggunakan timbal asetat atau ekstraksi kedalam alkali atau karbonat, diikuti dengan pengasaman (asidifikasi). Alternatif lain serbuk materi tumbuhan diekstraksi dalam aparatus Soklet menggunakan sistem pelarut tertentu.

Flavonoid terutama glikosida dapat terdegradasi oleh enzim ketika pengumpulan material tumbuhan masih segar atau tidak kering. Material tumbuhan kering yang digunakan umumnya dalam bentuk serbuk. Ekstraksi pelarut menggunakan pelarut sesuai dengan jenis flavonoid yang diinginkan. Flavonoid kurang polar (isoflavan, flavanon, flavon termetilasi, dan flavonol) diekstraksi dengan kloroform, diklorometan, dietil eter atau etil asetat sedangkan flavonoid glikosida dan aglikon lebih polar diekstraksi dengan etanol atau campuran alkohol-air (Hostettmann & Marston, 2006).

Serbuk material tumbuhan dapat juga diekstraksi dalam aparatus Soxhlet, pertama dengan heksana untuk menghilangkan lipid dan kemudian etil asetat atau etanol untuk mendapatkan fenolik. Selanjutnya dapat dilakukan ekstraksi pelarut dengan diklorometan akan mengekstrak flavonoid aglikon dan materail kurang

polar selanjutnya dengan alkohol akan mengekstrak flavonoid glikosida dan konstituen polar (Hostettmann & Marston, 2006).

Kromatografi lapis tipis (KLT), kromatografi poliamida dan elektroforesis kertas merupakan teknik pemisahan umum untuk fenolik. Dari metode tersebut, KLT tetap digunakan untuk analisis flavonoid. Penggunaannya cepat, sederhana dan versatile method untuk senyawaan polifenolik dalam ekstrak tumbuhan dan dalam fraksinasi. Kebanyakan publikasi umumnya menggunakan *high performance liquid chromatography* (HPLC) untuk analisis kualitatif dan kuantitatif. Flavonoid dapat dipisahkan, terkuantifikasi dan diidentifikasi dalam satu operasional dengan kopling detektor *high performace liquid chromatography* (HPLC) ke *ultraviolet* (UV), mass spectrometry (MS) atau *nuclear magnetic resonance* (NMR) (Gambar 12) (Hostettmann & Marston, 2006).



Gambar 12. Analisis LC-UV-MS dari ekstrak metanol

HPLC menjadi teknik yang paling populer untuk pemisahan flavonoid baik skala preparatif dan analitik. Pembuktian dalam instrumentasi, material packing dan teknologi kolom diperkenalkan setiap waktu membuat teknik ini lebih atraktif.

Tabel 4. Preparatif Pemisahan Flavonoid dengan HPLC

Sample	Column	Eluent
Phenolics from <i>Picea abies</i>	Nucleosil 100-7C ₁₈ 250 × 21 mm	MeOH-H ₂ O, gradient
Chalcones from <i>Myrica serrata</i>	LiChrosorb Diol 7 μm, 250 × 16 mm	MeOH-H ₂ O, 55:45
	Nucleosil 100-7C ₁₈ 250 × 21 mm	MeOH-H ₂ O, 76:24
Flavones from <i>Tanacetum parthenium</i>	LiChrospher RP-18 250 × 25 mm	CH ₃ CN-H ₂ O, 3:7
Flavone glycosides from <i>Lysionotus pauciflorus</i>	LiChrosorb RP-18 250 × 10 mm	CH ₃ CN-H ₂ O, 1:4
Flavonoid glucuronides from <i>Malva sylvestris</i>	Spherisorb ODS-2 5 μm, 250 × 16 mm	CH ₃ CN-H ₂ O-THF-HOAc, 205:718:62:15
Flavonol galloyl-glycosides from <i>Acacia confusa</i>	Hyperprep ODS 250 × 10 mm	CH ₃ CN-H ₂ O, gradient
Flavanones from <i>Greigia sphacelata</i>	LiChrospher Diol 5 μm, 250 × 4.6 mm	Hexane-EtOAc, 7:3
Prenylated flavonoids from <i>Anaxagorea luzonensis</i>	Asahipack ODP-90 10 μm, 300 × 28 mm	CH ₃ CN-H ₂ O, 45:55
Prenylated isoflavonoids from <i>Erythrina vogelii</i>	μBondapak C ₁₈ 10 μm, 100 × 25 mm	MeOH-H ₂ O, isocratic
Biflavones from <i>Cupressocyparis leylandii</i>	LiChrospher RP-18 7 μm, 250 × 10 mm	MeOH-H ₂ O, 72:28
Anthocyanin glycosides	Spherisorb ODS-2	MeOH-5% HCOOH

4.6 Teknik ekstraksi

Secara umum, ada tiga teknik ekstraksi konvensional yaitu dengan menggunakan pelarut, uap air dan supercritical fluids (Starman dan Nijhuis, 1996). Metode ekstraksi yang umum digunakan dalam mengisolasi senyawa metabolit sekunder yaitu dengan maserasi (penggunaan pelarut). Maserasi merupakan proses perendaman sampel dengan pelarut organik dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruangan. Proses ini sangat menguntungkan dalam isolasi senyawa bahan alam, karena dengan perendaman sampel tanaman mengakibatkan terjadinya pemecahan dinding dan membran sel akibat perbedaan tekanan antara di dalam sel dan di luar sel sehingga metabolit sekunder yang berada di dalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut organik dan ekstraksi senyawa akan sempurna karena dapat diatur lama perendaman yang dilakukan. Pemilihan pelarut untuk proses maserasi akan memberikan efektivitas yang tinggi dengan memperhatikan kelarutan senyawa bahan alam dalam pelarut tersebut. Secara umum, pelarut metanol merupakan pelarut yang paling banyak digunakan dalam proses isolasi senyawa organik bahan alam karena dapat melarutkan seluruh golongan metabolit sekunder (Darwis, 2000). Hasil yang diperoleh berupa ekstrak kasar yang telah diuapkan pelarutnya dengan rotari evaporator, yang mana seluruh senyawa bahan alam yang terlarut dalam pelarut yang akan digunakan berada pada ekstrak kasar tersebut. Selanjutnya,

ekstrak kasar tersebut dapat dipisahkan berdasarkan komponen-komponen dengan metode fraksinasi partisi dengan menggunakan corong pisah.

Metode ini menggunakan beberapa pelarut organik yang berbeda kepolarannya yaitu pelarut non polar, semi polar, dan polar dengan menggunakan perbandingan pelarut yang tepat sehingga akan terjadi pemisahan senyawa-senyawa tersebut sesuai dengan tingkat kepolaran. Sebagai contoh senyawa non polar akan larut dalam pelarut yang bersifat non polar, senyawa polar akan larut dalam pelarut polar dan yang semi polar akan larut dalam pelarut semi polar (Darwis, 2000). Dalam proses skrining, ekstraksi, fraksinasi dan purifikasi tanaman, pengaruh pelarut sangat penting. Oleh karena itu, untuk mendapatkan hasil yang maksimal, harus selektif dalam memilih pelarut dan mengetahui sifat masing-masing pelarut yang akan digunakan (Markom dkk., 2007).

4.7 Teknik Isolasi dan Purifikasi Senyawa Metabolit Sekunder

Dalam proses purifikasi dan identifikasi jumlah komponen senyawa metabolit sekunder dalam suatu bahan alam, dapat menggunakan teknik kromatografi. Teknik kromatografi merupakan metode pemisahan zat terlarut oleh suatu proses migrasi diferensial dinamis dalam sistem yang terdiri dari dua fase atau lebih. Salah satu diantaranya bergerak secara berkesinambungan dalam arah tertentu dan di dalamnya zat-zat itu menunjukkan perbedaan dalam absorpsi, partisi, kelarutan, tekanan uap, ukuran molekul atau kecepatan muatan ion. Ada beberapa teknik kromatografi yang saling berkaitan dan secara umum digunakan dalam melakukan purifikasi sekaligus mengidentifikasi komponen-komponen senyawa dalam suatu sampel antara lain kromatografi lapis tipis (KLT), kromatografi kolom, kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT= HPLC "High Performance Liquid Chromatography"), kemudian dikarakterisasi dengan menggunakan LC-MS (Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy) (Murti, 2006)

BAB 5 Potensi Antimikrobia

5.1 Bakteri

5.1.1 Pengertian Bakteri

Bakteri merupakan mikroorganisme yang bersifat uniseluler, termasuk kelas Schizomycetes. Pada umumnya bakteri tidak mempunyai klorofil dan reproduksinya secara asexual secara pembelahan transfersal atau biner. Sifat-sifat bakteri yang penting adalah bersifat saprofit atau parasit, patogen terhadap manusia dan hewan atau tumbuhan. Berdasarkan atas bentuknya dapat dibedakan menjadi tiga bentuk umum, yaitu bentuk bulat, batang, dan melengkung.

5.1.2 Morfologi Bakteri

Bakteri mempunyai bentuk dan ukuran yang sangat beragam. Sebagian besar sel bakteri memiliki diameter 0,2-2 mikron dan panjang 2-8 mikron. Berdasarkan bentuk bakteri digolongkan menjadi tiga golongan utama, yaitu bentuk kokus (bulat), bentuk basil (batang), dan bentuk spiral.

Biasanya sel bakteri yang muda berukuran jauh lebih besar dari pada sel yang tua. Bentuk dan ukuran suatu bakteri dapat dipengaruhi oleh faktor lingkungan seperti temperatur inkubasi, umur kultur, dan komposisi media pertumbuhan. Berdasarkan bentuk morfologi, ada beberapa bentuk dasar bakteri, yaitu bulat (tunggal: *coccus*, jamak: *cocci*), batang atau silinder (tunggal: *bacillus*, jamak: *bacilli*), dan spiral yaitu berbentuk batang melengkung atau melingkar-lingkar .

Bakteri kokus biasanya berbentuk bulat atau lonjong, hidup sendiri-sendiri berpasangan, membentuk rantai panjang atau kubus tergantung cara bakteri itu membelah diri dan kemudian melekat satu sama lain saat pembelahan. Kokus yang tetap berpasangan membelah disebut dengan diplokokus (*diplococcus*). Streptokokus (*streptococcus*) adalah kokus yang membelah dalam satu bidang dan tidak memisahkan diri sehingga berbentuk rantai. Kokus yang membelah dalam tiga bidang yang saling tegak lurus sehingga membentuk kubus adalah *Sarcinae*, sedangkan kokus yang membelah membentuk gugusan atau berkelompok seperti

buah anggur adalah bakteri *Staphylococcus*. Bentuk morfologi kokus berbeda beda seringkali digunakan untuk mengidentifikasi jenis bakteri golongan kokus.

Bakteri basil adalah golongan bakteri yang memiliki bentuk seperti batang atau silinder. Bakteri ini mempunyai ukuran yang sangat beragam. Basil umumnya terlihat sebagai batang tunggal. Beberapa bakteri basil berpasangan setelah pembelahan sel. Bentuk basil terdiri atas diplobasilus (*diplobacillus*), streptobasilus (*streptobacillus*), dan kokobasilus (*cocobacillus*).

Bakteri spiral adalah bakteri yang mempunyai bentuk yang tidak lurus seperti basil tetapi mempunyai satu atau beberapa lekukan. Bakteri spiral dibagi menjadi (*i*) *vibrio*, yaitu bakteri yang berbentuk tabung yang melengkung menyerupai bentuk koma, (*ii*) *spirillum*, yaitu bakteri yang berbentuk spiral atau pilikan dengan selnya yang kokoh, dan (*iii*) *spiroketa*, yaitu bakteri yang berbentuk spiral dan tubuhnya sangat lentur sehingga dapat bergerak bebas. Kemampuan bergerak ini dimungkinkan karena adanya kontraksi yang lentur dari sumbu filamen atau flagel yang terdapat di permukaan dinding sel bakteri.

5.1.3 Struktur Bakteri

Struktur bakteri terbagi menjadi dua, yaitu :

- 1) Struktur dasar (dimiliki oleh hampir semua jenis bakteri) meliputi :
 - a. Dinding sel tersusun dari peptidoglikan yaitu gabungan protein dan polisakarida (ketebalan peptidoglikan membagi bakteri menjadi bakteri gram positif bila peptidoglikannya tebal dan bakteri gram negatif bila peptidoglikannya tipis).
 - b. Membran plasma adalah membran yang menyelubungi sitoplasma tersusun atas lapisan fosfolipid dan protein.
 - c. Sitoplasma adalah cairan sel.
 - d. Ribosom adalah organel yang tersebar dalam sitoplasma, tersusun atas protein dan RNA.
 - e. Granula penyimpanan, karena bakteri menyimpan cadangan makanan yang dibutuhkan)
- Struktur tambahan (dimiliki oleh jenis bakteri tertentu) meliputi : kapsul, flagellum, pilus, fimbris, klorosom, vakuola gas dan endospora.

5.1.4 Klasifikasi Bakteri Berdasarkan Pewarnaan

Bakteri hidup tersebar di alam, antar lain di tanah, udara, air, dan makanan. Secara garis besar bakteri dapat dibedakan atas bakteri Gram positif dan Gram negatif.

- a) Bakteri Gram Negatif memiliki dinding sel yang terdiri atas membran sel, lapisan peptidoglikon dan membran luar. Pada pengecatan bakteri Gram negatif warna cat yang pertama (Gram A) dilunturkan karena tidak tahan terhadap alkohol dan mengikat warna yang kedua (warna kontras) sehingga bakteri berwarna merah. Warna tersebut merupakan warna safranin yang mewarnai membran luar. Contoh bakteri Gram negatif yaitu *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitis*, *Branhamella catanhalis*, *Escherichia coli*, *Salmonella tyhposa* dan lain-lain.
- b) Bakteri Gram Positif memiliki sel yang terdiri atas membran sel dan berlapis-lapis peptidoglikon. Pada pengecatan bakteri gram positif tetap mengikat warna cat pertama (Gram A) karena tahan terhadap alkohol dan tidak mengikat warna cat kedua (warna kontras) sehingga bakteri berwarna ungu yang mewarnai peptidoglikon. Contoh bakteri Gram Positif yaitu *Staphylococcus pneumonia*, *Bacillus anthracis*, *Staphylococcus aureus* dan lain-lain.

5.1.5 Fase Pertumbuhan Bakteri

Ada empat macam fase pertumbuhan bakteri, yaitu :

- a. Fase Lag, merupakan fase adaptasi yaitu fase penyesuaian bakteri pada suatu lingkungan baru. Ciri fase lag adalah tidak adanya peningkatan jumlah sel yang ada hanyalah peningkatan jumlah ukuran sel. Fase lag tergantung pada kondisi dan jumlah awal bakteri dan media pertumbuhan.
- b. Fase log (fase eksponensial), fase dimana bakteri tumbuh dan membelah pada kecepatan maksimum tergantung pada genetika mikroorganisme, sifat media dan kondisi pertumbuhan.
- c. Fase stasioner, pertumbuhan bakteri berhenti dan terjadi keseimbangan antara jumlah sel yang mati. Pada fase ini terjadi akumulasi produk buangan yang toksik. Pada sebagian besar kasus pergantian sel terjadi dalam fase ini.
- d. Fase kematian, jumlah sel yang mati meningkat. Faktor penyebabnya adalah ketidakterediaan nutrisi dan akumulasi produk buangan yang toksik.

5.1.6 Fase Pertumbuhan Bakteri

Ada empat macam fase pertumbuhan bakteri, yaitu :

- 1) Fase Lag, merupakan fase adaptasi yaitu fase penyesuaian bakteri pada suatu lingkungan baru. Ciri fase lag adalah tidak adanya peningkatan jumlah sel yang ada hanyalah peningkatan jumlah ukuran sel. Fase lag tergantung pada kondisi dan jumlah awal bakteri dan media pertumbuhan.
- 2) Fase log (fase eksponensial), fase dimana bakteri tumbuh dan membelah pada kecepatan maksimum tergantung pada genetika mikroorganisme, sifat media dan kondisi pertumbuhan.
- 3) Fase stasioner, pertumbuhan bakteri berhenti dan terjadi keseimbangan antara jumlah sel yang mati. Pada fase ini terjadi akumulasi produk buangan yang toksik. Pada sebagian besar kasus pergantian sel terjadi dalam fase ini.
- 4) Fase kematian, jumlah sel yang mati meningkat. Faktor penyebabnya adalah ketidaktersediaan nutrisi dan akumulasi produk buangan yang toksik.

5.1.7 Faktor-faktor yang Mempengaruhi Pertumbuhan Bakteri

Pertumbuhan pada bakteri mempunyai arti perbanyakan sel dan peningkatan ukuran populasi. Faktor-faktor yang mempengaruhi pertumbuhan bakteri atau kondisi untuk pertumbuhan optimum adalah :

a. Bahan dasar

- 1) Air (H₂O) sebagai pelarut
- 2) Agar (dari rumput laut) yang berfungsi untuk pematat media. Agar sulit di degradasi oleh mikroorganisme pada umumnya dan mencair pada suhu 45°C.
- 3) Gelatin juga memiliki fungsi yang sama seperti agar. Gelatin adalah polimer asam amino yang diproduksi dari kolagen. Kekurangannya adalah lebih banyak jenis mikroba yang mampu menguraikannya dibanding agar.
- 4) *Silica gel*, yaitu bahan yang mengandung natrium silikat. Fungsinya juga sebagai pematat media. Silica gel khusus digunakan untuk memadatkan media bagi mikroorganisme autotrof obligat.

b. Nutrisi atau zat makanan

Media harus mengandung unsur-unsur yang diperlukan untuk metabolisme sel yaitu berupa unsur makro seperti C, H, O, N, P, unsur mikro seperti Fe, Mg dan unsur pelikan.

- 1) Sumber karbon dan energi yang dapat diperoleh berupa senyawa organik atau anorganik sesuai dengan sifat mikroanya. Jasad heterotrof memerlukan sumber karbon organik antara lain dari karbohidrat, lemak, protein dan asam organik.
- 2) Sumber nitrogen mencakup asam amino, protein atau senyawa bernitrogen lain. Sejumlah mikroba dapat menggunakan sumber anorganik seperti urea.
- 3) Vitamin-vitamin.

c. Bahan tambahan

Bahan-bahan tambahan yaitu bahan yang ditambahkan ke medium dengan tujuan tertentu, misalnya *phenolred* (indikator asam basa) ditambahkan untuk indikator perubahan pH akibat produksi asam organik hasil metabolisme. Antibiotik ditambahkan untuk menghambat pertumbuhan mikroba non-target/kontaminan.

d. Bahan yang sering digunakan dalam pembuatan media

- 1) Agar, agar dapat diperoleh dalam bentuk batangan, granula atau bubuk dan terbuat dari beberapa jenis rumput laut. Kegunaannya adalah sebagai pematat (*gelling*) yang pertama kali digunakan oleh Fraw & Walther Hesse untuk membuat media. Jika dicampur dengan air dingin, agar tidak akan larut. Untuk melarutkannya harus diaduk dan dipanasi, pencairan dan pematatan berkali-kali atau sterilisasi yang terlalu lama dapat menurunkan kekuatan agar, terutama pada pH yang asam.
- 2) *Peptone*. *Peptone* adalah produk hidrolisis protein hewani atau nabati seperti otot, liver, darah, susu, casein, lactalbumin, gelatin dan kedelai. Komposisinya tergantung pada bahan asalnya dan bagaimana caramemperolehnya.
- 3) *Meat extract*. *Meat extract* mengandung basa organik terbuat dari otak, limpa, plasenta dan daging sapi.

- 4) *Yeast extract*. *Yeast extract* terbuat dari ragi pengembang roti atau pembuat alkohol. *Yeast extract* mengandung asam amino yang lengkap & vitamin (B complex).
- 5) Karbohidrat. Karbohidrat ditambahkan untuk memperkaya pembentukan asam amino dan gas dari karbohidrat. Jenis karbohidrat yang umumnya digunakan dalam amilum, glukosa, fruktosa, galaktosa, sukrosa, manitol, dan lain-lain. Konsentrasi yang ditambahkan untuk analisis fermentasi adalah 0,5-1%.

5.1.8 Cara Perkembangbiakan Bakteri

Bakteri umumnya melakukan reproduksi atau berkembang biak secara aseksual (tak kawin) dengan membelah diri. Pembelahan sel pada bakteri adalah pembelahan biner yaitu setiap sel membelah menjadi dua. Reproduksi bakteri secara seksual yaitu dengan pertukaran materi genetik dengan bakteri lainnya. Pertukaran materi genetik disebut rekombinasi genetik atau rekombinasi DNA. Rekomendasi genetik dapat dilakukan dengan tiga cara yaitu :

1. Transformasi adalah pemindahan sedikit materi genetik, bahkan satu gen saja dari satu sel bakteri ke sel bakteri yang lainnya.
2. Transduksi adalah pemindahan materi genetik satu sel bakteri ke sel bakteri lainnya dengan perantara organisme yang lain yaitu bakteriofage (virus bakteri).
3. Konjugasi adalah pemindahan materi genetik berupa plasmid secara langsung melalui kontak sel dengan membentuk struktur seperti jembatan diantara dua sel bakteri yang berdekatan. Umumnya terjadi pada bakteri Gram negatif.

5.1.9 Bakteri *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus merupakan bakteri Gram positif berbentuk bulat berdiameter 0,7-1,2 μm , tersusun dalam kelompok-kelompok yang tidak teratur seperti buah anggur, fakultatif anaerob, tidak membentuk spora, dan tidak bergerak. Bakteri ini tumbuh pada suhu optimum 37°C, tetapi membentuk pigmen paling baik pada suhu kamar (20-25°C). Koloni pada perbenihan padat berwarna abu-abu sampai kuning keemasan, berbentuk bundar, halus, menonjol dan

berkilau. Lebih dari 90% isolate klinik menghasilkan *S. aureus* yang mempunyai kapsul polisakarida atau selaput tipis yang berperan dalam virulensi bakteri.

Sebagian bakteri *Staphylococcus* merupakan flora normal pada kulit, saluran pernafasan dan saluran pencernaan makanan pada manusia. Bakteri ini juga ditemukan di udara dan lingkungan sekitar. *S.aureus* yang pathogen bersifat invasive, menyebabkan hemolisis, membentuk koagulase dan mampu meragikan manitol. Infeksi oleh *S. aureus* ditandai dengan kerusakan jaringan yang disertai abses bernanah.

Klasifikasi *Staphylococcus aureus* menurut Bergey dalam Cappucino (1998) adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Monera
divisi	: Firmicutes
kelas	: Bacilli
ordo	: Bacilalles
family	: Staphylocacae
genus	: Staphylococcus
spesies	: <i>Staphylococcus aureus</i>

Staphylococcus aureus biasanya peka terhadap antibiotik beta-laktam dan makrolida, tetrasiklin, novobiosin dan kloramfenikol, tetapi resisten terhadap polimixin.

5.1.10 Bakteri *Salmonella typhi*

Salmonella typhi merupakan bakteri batang Gram negatif dan tidak membentuk spora, serta memiliki kapsul. Bakteri ini juga bersifat fakultatif, dan sering disebut sebagai *facultative intra-cellular parasites*. Dinding selnya terdiri atas murein, lipoprotein, fosfolipid, protein, dan lipopolisakarida (LPS) dan tersusun sebagai lapisan-lapisan. Ukuran panjangnya bervariasi dan sebagian besar memiliki *peritrichous flagella* sehingga bersifat motil. *Salmonella typhi* membentuk asam dan gas dari glukosa dan *mannosa*. Bakteri ini tahan hidup dalam air yang membeku untuk waktu yang lama.

Klasifikasi *Salmonella typhi* adalah sebagai berikut :

phylum	: Eubacteria
class	: Proteobacteria
ordo	: Eubacteriales
family	: Enterobacteriaceae

genus : *Salmonella*
species : *Salmonella enterica*
subspesies : *enteric*
serotipe : *typhi*

Demam tifoid merupakan penyakit sistematik yang ditandai dengan demam dan nyeri abdomen dan muncul akibat infeksi *Salmonella typhi* dan *Salmonella paratyphi*. Masa inkubasi *Salmonella typhi* berkisar 3-21 hari, gejala klinis yang umum adalah demam yang panjang (38,8° sampai 40,5°C). Demam ini dapat berkelanjutan selama 4 minggu jika tidak segera ditangani.

Pada minggu pertama, keluhan yang dapat muncul sangat umum, seperti demam, nyeri kepala, pusing, nyeri otot, anoreksia, mual, muntah, obstipasi atau diare, perasaan tidak enak pada perut, batuk dan epistaksis. Jika dilakukan pemeriksaan fisik, hanya dapat ditemukan suhu tubuh yang meningkat. Pada minggu kedua gejala mulai lebih menonjol, yakni demam, bradikardi relatif, lidah yang berselaput, hepatomegali, spleno *megali*, meteorismus, gangguan mental berupa *somnolen*, *stupor*, koma, *delirium* atau *psikosis*.

5.2. Antibakteri

5.2.1 Pengertian Antibakteri

Antibakteri adalah zat yang menghambat pertumbuhan bakteri dan digunakan secara khusus untuk mengobati infeksi. Mekanisme kerja antibakteri dapat terjadi melalui beberapa cara yaitu kerusakan pada dinding sel, perubahan permeabilitas sel, dan menghambat sintesis protein dan asam nukleat. Banyak faktor dan keadaan yang dapat mempengaruhi kerja antibakteri, antara lain konsentrasi antibakteri, jumlah bakteri, spesies bakteri, adanya bahan organik, suhu, dan pH lingkungan.

Senyawa antibakteri terdiri atas beberapa kelompok berdasarkan mekanisme daya kerjanya atau tujuan kegunaannya. Bahan antibakteri dapat secara fisik atau kimia dan berdasarkan peruntukannya dapat berupa desinfektan, antiseptik, sterilizer, sanitizer dan sebagainya. Bahan kimia yang digunakan dalam pengobatan (kemoterapeutik) menjadi pilihan bila dapat mematikan bakteri disebut bakterisidal, sedangkan bahan kimia yang menghambat pertumbuhan disebut bakteriostatik. Bahan antimikrobal dapat bersifat bakteriostatik pada konsentrasi rendah, namun bersifat bakterisidal pada konsentrasi tinggi.

Aktivitas antibakteri suatu senyawa kimia ditentukan oleh konsentrasi dan sifat dari bahan yang digunakan. Umumnya hampir semua senyawa kimia pada konsentrasi yang sangat tinggi dapat bersifat racun. Mekanisme daya kerja antimikroba terhadap sel dapat dibedakan atas beberapa kelompok sebagai berikut:

1. Merusak dinding sel
2. Mengganggu permeabilitas sel
3. Merusak molekul protein dan asam nukleat
4. Menghambat aktivitas enzim
5. Menghambat sintesa asam nukleat

Aktivitas antibakteri yang dapat diamati secara langsung adalah perkembangbiakannya. Oleh karena itu bakteri disebut mati jika tidak dapat berkembang biak.

5.2.2 Mekanisme Aksi Antibakteri

Kadar mineral yang diperlukan untuk menghambat pertumbuhan mikroba atau membunuhnya masing-masing dikenal sebagai kadar hambat minimal (KHM) dan kadar bunuh minimal (KBM). Mekanisme penghambatan mikroorganisme oleh senyawa antimikroba dapat disebabkan oleh beberapa faktor, antara lain: gangguan pada penyusunan dinding sel, peningkatan permeabilitas membran sel yang dapat menyebabkan kehilangan komponen penyusun sel, menginaktivasi enzim, dan destruksi atau kerusakan fungsi material genetik. Kemampuan senyawa antimikroba untuk menghambat aktivitas pertumbuhan mikroba dalam sistem pangan dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya temperatur, pH (keasaman), ketersediaan oksigen, dan interaksi atau sinergi antara beberapa faktor tersebut.

5.3 Uji antibakteri ekstrak kalus tanaman sarang semut

Di Kalimantan, jenis tumbuhan Sarang semut (*Myrmecodia tuberosa* Jack) banyak sekali ditemukan di daerah pedalaman Kabupaten Bulungan yang biasanya digunakan masyarakat setempat sebagai obat tradisional, diantaranya untuk menghilangkan pegal linu, sakit kepala, asam urat, diare, kolesterol, maag dan kanker. Dalam uji *in vitro*, terbukti bahwa sarang semut ampuh menghambat

pertumbuhan sel kanker seperti kanker serviks, kanker paru dan kanker usus, sel kanker servik dan payudara (HeLa dan MCM-B2 cells) (Soeksmanto dkk.,2010), sel kanker mulut (sel B88) (Supriatno, 2014) dan juga berfungsi sebagai anti oksidan dan anti mikroba (Prachayasittikul dkk., 2008).

Khasiat sarang semut sebagai tanaman obat mengakibatkan banyak orang yang mencari tumbuhan sarang semut di alam, sehingga kontinuitas keberadaan tumbuhan tersebut menjadi terancam. Selain itu, bagian tumbuhan sarang semut yang banyak digunakan untuk pengobatan oleh masyarakat adalah bagian umbinya. Penggunaan umbi sebagai bahan obat tradisional dapat mematikan tanaman sarang semut karena tumbuhan sarang semut tidak dapat berkembang biak. Oleh sebab itu perlu dilakukan usaha pelestarian melalui mekanisme pemuliaan dan pembudidayaan.

Salah satu usaha pelestarian tanaman yang dapat digunakan untuk mempelajari sintesis metabolit sekunder secara kultur jaringan adalah kultur kalus. Uji yang dilakukan untuk membuktikan hal tersebut salah satunya dengan melakukan uji aktivitas antibakteri pada ekstrak kalus tumbuhan sarang semut.

Uji aktivitas antibakteri dilakukan untuk mengetahui kadar terkecil suatu obat atau zat yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri secara in vitro. Penelitian dilakukan secara in vitro agar dapat ditentukan potensi zat antibakteri, konsentrasi, dan kepekaan bakteri terhadap konsentrasi zat-zat tertentu. Uji kepekaan ini dapat dikerjakan dengan menggunakan metode dilusi maupun metode difusi. Pengukuran zat antibakteri dalam menghambat dan membunuh pertumbuhan bakteri secara in vitro, dapat dilakukan dengan dua cara yaitu metode difusi dan dilusi.

5.3.1 Metode difusi

Adalah metode yang menggunakan antimikroba dengan kadar yang menurun secara bertahap, baik dengan media cair atau padat yang kemudian media diinokulasi bakteri uji dan diinkubasi. Tahap akhir dilarutkan anti mikroba dengan kadar yang menghambat atau mematikan. Metode difusi yang biasa digunakan adalah metode *disc diffusion* (Uji Kirby & Baur). Metode ini untuk menentukan aktivitas agen antimikroba. Piringan yang berisi agen antimikroba diletakkan pada media agar yang telah ditanami mikroorganisme yang akan

berdifusi pada media agar tersebut. Area jernih mengindikasikan adanya hambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh agen antimikroba pada permukaan media agar.

Metode difusi ini dipengaruhi banyak faktor disamping interaksi antara obat dan bakteri (misalnya sifat perbenihan, daya difusi, ukuran molekul dan stabilitas obat). Kelemahan metode difusi adalah metode ini tidak dapat menentukan apakah suatu obat bersifat bakterisida dan bakteristatik. Akan tetapi, metode difusi relatif sederhana, tidak mahal dan sering digunakan bila fasilitas laboratorium yang memadai tidak tersedia. Prinsip kerja dari metode ini sangat sederhana, yaitu ketika kertas cakram yang berisi sejumlah obat tertentu ditempatkan pada permukaan media padat yang sebelumnya telah diinokulasi bakteri uji pada permukaannya, obat tersebut akan berdifusi secara radial melalui agar, setelah di inkubasi dan bakteri tersebut tumbuh, maka akan terbentuk zona jernih sekitar cakram. Adanya zona jernih yang melingkar di sekitar cakram menunjukkan agen obat menghambat pertumbuhan bakteri resisten terhadap obat tersebut.

5.3.2 Metode dilusi

Dibedakan menjadi dua, yaitu dilusi cair (*broth dilution*) dan dilusi padat (*solid dilution*).

a. Metode dilusi cair

Adalah metode yang mengukur MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) atau KMH (Kadar Hambat Minum) dan MBC (*Minimum Bactericidal Concentration*) atau KBM (Kadar Bunuh Minum). Cara yang dilakukan adalah dengan cara membuat seri pengenceran agen antimikroba pada medium cair yang ditambahkan dengan mikroba uji. Larutan uji agen antimikroba pada kadar terkecil yang terlihat jernih tanpa adanya pertumbuhan mikroba uji ditetapkan sebagai KMH. Larutan yang ditetapkan KMH tersebut selanjutnya diukur ulang pada media cair tanpa penambahan mikroba uji ataupun agen antimikroba, dan diinkubasi selama 18-24 jam. Media cair yang tetap terlihat jernih setelah diinkubasi ditetapkan sebagai KBM.

b. Metode Dilusi Padat

Serupa dengan metode dilusi cair, namun menggunakan media padat keuntungan metode ini adalah satu konsentrasi agen antimikroba yang di uji dapat digunakan untuk menguji beberapa mikroba uji.

5.4 Daya Hambat

Sensitifitas menyatakan bahwa uji sensitifitas bakteri merupakan suatu metode untuk menentukan tingkat kerentanan bakteri terhadap zat antibakteri dan untuk mengetahui senyawa murni yang memiliki aktivitas antibakteri. Metode ujisensitifitas bakteri adalah metode cara bagaimana mengetahui dan mendapatkan produk alam yang berpotensi sebagai bahan antibakteri serta mempunyai kemampuan untuk menghambat pertumbuhan atau mematikan bakteri pada konsentrasi rendah. Seorang ilmuwan dari Perancis bahwa metode difusi agar dari prosedur Kirby-Bauer, sering digunakan untuk mengetahui sensitifitas bakteri. Prinsip dari metode ini adalah penghambatan terhadap pertumbuhan mikroorganisme, yaitu zona hambatan yang terlihat sebagai daerah jernih disekitar cakram kertas. Zona hambatan merupakan tempat dimana bakteri terhambat pertumbuhannya akibat antibakteri atau antimikroba.

5.4.1 Uji Kematian Larva Udang (*Brine Shrimp Lethality Test*) (BSLT) Ekstrak Kalus Sarang Semut

Sebelum penggunaannya sebagai bahan obat, perlu diuji terlebih dahulu apakah ekstrak etanol kalus sarang semut memiliki sifat antibakteri. Aktivitas antibakteri juga erat kaitannya dengan toksisitas tanaman dan diketahui toksisitas tanaman erat kaitannya dengan senyawa-senyawa metabolit sekunder yang ada di dalamnya (Lisdawati dkk, 2006).

Salah satu metode awal yang sering digunakan untuk mengamati toksisitas senyawa dan merupakan metode penapisan untuk aktivitas antikanker senyawa kimia dalam ekstrak tumbuhan adalah *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) menggunakan larva udang *Artemia salina* Leach. Uji kematian larva udang merupakan uji pendahuluan untuk mengamati aktifitas farmakologi suatu senyawa. Larva udang *A. salina* Leach digunakan karena bersifat peka terhadap bahan uji karena keadaan membran kulitnya yang sangat tipis sehingga

memungkinkan terjadinya difusi zat dari lingkungan yang mempengaruhi metabolisme dalam tubuhnya (Meyer dkk, 1982. dalam Meilani, 2006).

Uji bioaktivitas menggunakan larva udang *Artemia salina* Leach. dikenal dengan istilah *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). BSLT adalah suatu metode penelusuran untuk menentukan bioaktivitas suatu ekstrak ataupun senyawa terhadap larva udang dari *A. salina*. Metode ini berkembang sebagai salah satu metode *bioassay* dalam mengisolasi senyawa aktif yang terdapat dalam suatu ekstrak tanaman. Lebih jauh lagi *bioassay* ini sering dikaitkan sebagai metode identifikasi senyawa anti kanker berasal dari tumbuhan. Uji bioaktivitas dengan menggunakan larva udang memiliki spektrum farmakologi yang luas, prosedurnya sederhana, cepat, tidak memerlukan biaya yang besar dan hasilnya dapat dipercaya.

Uji mortalitas larva udang merupakan salah satu metode uji bioaktif pada penelitian senyawa bahan alam dan sudah dilakukan sejak tahun 1956. Sejak saat itu telah banyak dilakukan pada studi lingkungan, toksisitas dan penapisan senyawa bioaktif dari jaringan tanaman. Uji ini merupakan uji pendahuluan untuk mengamati aktivitas farmakologi suatu senyawa. Adapun penerapan untuk sistem bioaktivitas dengan menggunakan larva udang tersebut, antara lain untuk mengetahui residu pestisida, anestetik lokal, senyawa turunan morpin, mikotoksin, karsinogenitas suatu senyawa dan polutan untuk air laut serta sebagai alternatif metode yang murah untuk uji sitotoksitas (Hamburger dan Hostettmann, 1991. dalam Meilani, 2006). Maksud utama uji toksisitas ialah menguji keamanan obat. Penafsiran keamanan obat untuk manusia dapat dilakukan melalui serangkaian percobaan toksisitas terhadap hewan uji. Senyawa aktif yang memiliki daya bioaktivitas tinggi diketahui berdasarkan nilai *Lethal Concentration 50 %* (LC_{50}), yaitu suatu nilai yang menunjukkan konsentrasi zat toksik yang dapat menyebabkan kematian hewan uji sampai 50 %. Data mortalitas yang diperoleh kemudian diolah dengan probit analisis untuk menentukan nilai LC_{50} pada derajat kepercayaan 95 %. Senyawa kimia berpotensi bioaktif jika mempunyai nilai LC_{50} kurang dari 1.000 ppm (Meyer dkk, 1982. dalam Meilani, 2006).

Udang relik asin (*brine shrimp*) atau artemia adalah udang-udangan tingkat rendah yang hidup sebagai zooplankton yang menghuni perairan-perairan yang berkadar garam tinggi (*salina*), baik dekat pantai maupun jauh di pedalaman laut.

A. salina Leach. diklasifikasikan sebagai berikut :

kingdom : Animalia
filum : Arthropoda
kelas : Crustacea
subklas : Branchipoda
ordo : Anostraca
famili : Artemiidae
genus : Artemia
spesies : *A. salina* Leach

Keunggulan penggunaan *A. salina* untuk uji BSLT ini ialah sifatnya yang peka terhadap bahan uji, waktu siklus hidup yang lebih cepat, mudah dibiakkan dan harganya yang murah. Sifat peka *A. salina* kemungkinan disebabkan oleh keadaan membran kulitnya yang sangat tipis sehingga memungkinkan terjadinya difusi zat dari lingkungan yang mempengaruhi metabolisme dalam tubuhnya.

Uji BSLT dengan menggunakan *A. salina* dilakukan dengan menetas telur-telur tersebut dalam air laut yang dibantu dengan aerasi. Telur *A. salina* akan menetas sempurna menjadi larva dalam waktu 24 jam. *A. Salina* yang baik digunakan untuk uji BSLT ialah yang berumur 48 jam sebab jika lebih dari 48 jam dikhawatirkan kematian *A. salina* bukan disebabkan toksisitas ekstrak melainkan oleh terbatasnya persediaan makanan (Meyer dkk, 1982. dalam Meilani, 2006).

Larva yang baru saja menetas berbentuk bulat lonjong dan berwarna kemerah-merahan dengan panjang 400 μm dengan berat 15 μg . Anggota badannya terdiri dari sepasang sungut kecil (anteluena atau antena I) dan sepasang sungut besar (antena atau antena II). Di bagian depan diantara kedua sungut kecil tersebut terdapat bintik merah yang berfungsi sebagai mata (oselus). Di belakang sungut besarnya terdapat sepasang mandibula (rahang) yang kecil, sedangkan di bagian perut (ventral) sebelah depan terdapat labrum.

Hasil uji toksisitas dengan menggunakan metode BSLT disajikan dalam Tabel 5 sebagai berikut:

Tabel 5. Nilai LC₅₀ (ppm) Ekstrak Etanol Kalus Sarang Semut (*M. tuberosa* Jack.) terhadap *A. salina* Leach. menggunakan pelarut air laut.

Konsentrasi (ppm)	Rata-rata <i>A. salina</i> yang mati	Rata-rata <i>A. salina</i> yang hidup	Persentase Kematian	LC ₅₀ (ppm)
1000	11	19	36.6	
500	6	24	20	

Konsentrasi (ppm)	Rata-rata <i>A. salina</i> yang mati	Rata-rata <i>A. salina</i> yang hidup	Persentase Kematian	LC ₅₀ (ppm)
250	2	28	6.6	1.316,46
125	0	30	0	
62.5	0	30	0	
31.2	0	30	0	
15.6	0	30	0	
7.8	0	30	0	

Untuk mengetahui bioaktivitas ekstrak etanol kalus sarang semut (*M. tuberosa* Jack.) maka dilakukan uji mortalitas terhadap larva udang (*A. salina* Leach.) dengan menggunakan BSLT (*brine shrimp lethality test*). Menurut Mc Laughlin (1998), pengamatan potensi bioaktivitas ini dilakukan berdasarkan nilai *Lethal Concentration 50 %* (LC₅₀) yaitu suatu nilai yang menunjukkan konsentrasi zat toksik yang dapat mengakibatkan kematian organisme sampai 50 %. Senyawa kimia dikatakan berpotensi aktif atau toksik bila mempunyai LC₅₀ kurang dari 1000 ppm dan dikatakan kurang aktif atau tidak toksik bila mempunyai LC₅₀ lebih dari 1000 ppm.

Berdasarkan hasil uji mortalitas larva udang dari ekstrak etanol kalus sarang semut diperoleh nilai LC₅₀ 1.316,46 ppm (Tabel 5). Nilai LC₅₀ dari uji mortalitas larva udang diperoleh dengan menggunakan Analisis Probit. Berdasarkan data tersebut diketahui bahwa ekstrak etanol tersebut kurang aktif atau lemah karena LC₅₀ yang diperoleh lebih besar dari 1000 ppm, tetapi sangat baik digunakan sebagai antioksidan. Senyawa fenolik pada tumbuhan mampu memberikan efek menguntungkan bagi kesehatan tubuh, terutama pada penyakit jantung koroner dan kanker, terutama karena memiliki aktivitas antioksidan. Kandungan senyawa flavonoid pada tumbuhan juga berperan sebagai antioksidan dalam tubuh manusia, sehingga sangat baik untuk pencegahan kanker, melindungi struktur sel dan memiliki hubungan sinergis dengan vitamin C (meningkatkan efektivitas vitamin C).

5.4.2 Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Kalus Sarang Semut

Metode yang digunakan untuk mengetahui adanya kandungan senyawa anti bakteri ekstrak etanol kalus tumbuhan sarang semut adalah *disc diffusion* (Uji

Kirby & Baur), dilakukan terhadap *Staphylococcus aureus* yang mewakili bakteri Gram positif dan *Salmonella typhi* yang mewakili bakteri Gram negatif.

Staphylococcus aureus merupakan bakteri penyebab keracunan yang memproduksi eteroksin. Bakteri ini sering ditemukan pada makanan-makanan yang mengandung protein tinggi, misalnya sosis, telur dan sebagainya. Memakan makanan yang dicemari oleh racun-racun *S. aureus* mengakibatkan penyakit usus yang menyebabkan mual, muntah, diare dan dehidrasi (Stainer, 1987). Sebagian besar *Salmonella typhi* bersifat patogen pada binatang dan merupakan sumber infeksi bagi manusia yang demam tifoid atau sering dikenal dengan nama tifosa. Rata-rata diameter zona bening yang terbentuk dari perlakuan yang dihasilkan dapat dilihat pada Tabel 6 sebagai berikut :

Tabel 6. Rata-Rata Diameter Zona Bening Perlakuan Ekstrak Etanol Kalus Sarang Semut (*Myrmecodia tuberosa* Jack) terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella typhi*

Bakteri Uji	Rata-rata Diameter Zona Hambat (mm)					
	Perlakuan					
	Kontrol (-)	34.64 %	39.97 %	46.13 %	53.23 %	Kontrol (+)
<i>S. aureus</i>	0 ^a	13.93 ^b	14.43 ^{bc}	15.33 ^{cd}	15.75 ^d	18.96 ^e
<i>S. typhi</i>	0 ^a	13.30 ^b	14.78 ^{bc}	15.95 ^c	16.05 ^c	15.86 ^c

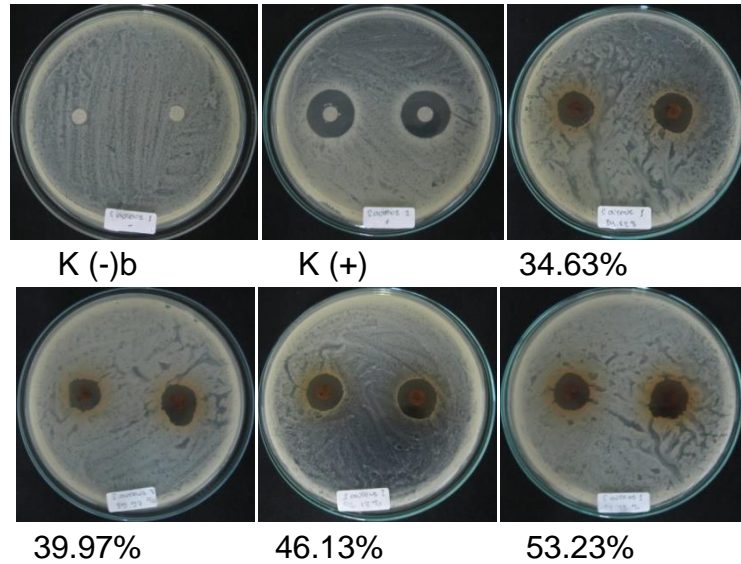
Keterangan: Notasi huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan nilai rata-rata berbeda nyata pada uji DMRT dengan taraf kepercayaan 95%.

Hasil pengujian aktivitas antibakteri ekstrak kalus sarang semut (*M. tuberosa* Jack.) terhadap bakteri *S. aureus* (Gambar 13) dan *S. typhi* (Gambar 14) menunjukkan adanya daerah hambatan pada pertumbuhan bakteri. Daerah hambatan pertumbuhan bakteri ditunjukkan dengan adanya zona bening yang terdapat disekeliling kertas cakram. Pengukuran zona hambatan dilakukan dengan mengukur diameter daerah jernih.

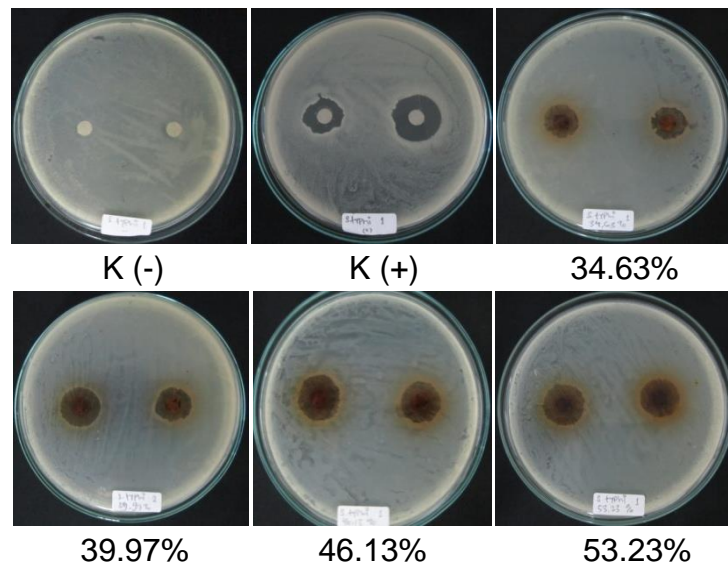
Dari Tabel 6 dapat diketahui bahwa rata-rata diameter zona hambatan paling tinggi yang terbentuk pada bakteri *S. aureus* terdapat pada konsentrasi 53.23 % yaitu 15.75 mm dan zona hambatan yang terbentuk paling rendah terdapat pada konsentrasi 34.64 % yaitu 13.93 mm. Pada bakteri *S. typhi*, zona hambatan yang terbentuk paling tinggi terdapat pada konsentrasi 53.23 % yaitu 16.05 mm dan zona hambatan yang terbentuk paling rendah terdapat pada konsentrasi 34.64 % yaitu 13.30 mm. Ini berarti semakin tinggi konsentrasi semakin besar zona hambatan yang terbentuk, hal ini diduga karena kandungan senyawa-senyawa aktif dari

Ekstrak etanol kalus sarang semut yang bersifat antibakteri (flavonoid). Menurut, fungsi flavonoid bagi tumbuhan adalah untuk mengatur pertumbuhan dan berfungsi sebagai antimikroba dan antivirus.

Gambaran zona hambat pengaruh ekstrak etanol kalus sarang semut (*M. tuberosa* Jack.) terhadap *S. aureus* dan *S. typhi* dapat dilihat pada Gambar 13 dan Gambar 14 berikut ini:



Gambar 13. Zona Hambat Pengaruh Ekstrak Kalus Sarang Semut (*M. tuberosa* Jack.) terhadap bakteri *S. aureus*



Gambar 14. Zona Hambat Pengaruh Ekstrak Kalus Sarang Semut

(*M. tuberosa* Jack.) terhadap bakteri *S. typhi*

Dalam pengujian aktivitas antibakteri digunakan akuades sebagai kontrol negatif dan kloramfenikol sebagai standar (kontrol positif). Penggunaan akuades disini juga sebagai pelarut untuk membuat variasi konsentrasi pada uji aktivitas antibakteri, alasan digunakan pelarut ini adalah agar daya hambat pertumbuhan bakteri yang dihasilkan tidak terpengaruh oleh pelarut. Dari hasil uji (Tabel 6) menunjukkan bahwa akuades yang digunakan sebagai kontrol negatif, tidak memiliki sifat sebagai antibakteri terhadap kedua jenis bakteri uji yang digunakan karena tidak terbentuk zona bening disekitar kertas cakram, maka zona hambat atau zona bening yang terbentuk dengan variasi konsentrasi murni dari ekstrak uji, tidak dipengaruhi oleh pelarut.

Kontrol positif yang digunakan adalah antibiotik kloramfenikol sebagai pembanding, rata-rata zona hambat yang terbentuk pada bakteri *S. aureus* sebesar 18.96 mm lebih besar dari zona hambat yang terbentuk pada konsentrasi 53.23 %, menunjukkan bahwa kemampuan kloramfenikol dalam menghambat bakteri *S. aureus* lebih tinggi dari ekstrak etanol daun sarang semut (*M. tuberosa* Jack.) dan pada bakteri *S. typhi* rata-rata zona hambat yang terbentuk sebesar 15.86 mm lebih besar dari konsentrasi 39.97 % dan lebih rendah dari konsentrasi 46.13 %, menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun sarang semut (*M. tuberosa* Jack.) memiliki kemampuan menghambat bakteri *S. typhi* lebih tinggi dari kloramfenikol pada konsentrasi 46.13 %.

Kloramfenikol merupakan jenis antibiotik yang memiliki spektrum kerja luas (dapat menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif dan Gram negatif). Kloramfenikol pada umumnya bersifat bakteriostatik (menghambat pertumbuhan bakteri) dan pada konsentrasi tinggi dapat bersifat bakterisidal (membunuh bakteri) pada mikroba tertentu.

BAB 6 Prospek Budidaya Sarang Semut Secara In Vitro

6.1 Kendala Budidaya Sarang Semut di Alam

Popularitas tumbuhan sarang semut yang melambung karena khasiatnya sebagai tumbuhan obat mengakibatkan banyak orang yang memburu tumbuhan sarang semut di alam, sehingga kontinuitas keberadaan tumbuhan tersebut di alam menjadi terancam. Pengambilan secara besar-besaran dari habitatnya di hutan-hutan Kalimantan tanpa upaya budidaya atau peremajaan serta pembalakan hutan secara liar mengakibatkan penurunan populasi tanaman sarang semut dan habitatnya menjadi rusak. Kejadian tersebut menyebabkan terjadinya erosi genetik dari tanaman sarang semut yang dapat menimbulkan kepunahan jika tidak dilakukan tindakan untuk menanggulangnya. Oleh sebab itu perlu dilakukan usaha pelestarian melalui mekanisme pemuliaan dan pembudidayaan.

Sampai saat ini belum ada upaya masyarakat untuk membudidayakan tanaman sarang semut. Hal ini disebabkan karena masyarakat lebih tertarik mengambil tanaman langsung ke hutan-hutan tanpa berniat untuk membudidayakannya. Selain itu faktor lingkungan sangat berperan penting terhadap pertumbuhan sarang semut. Kondisi lingkungan yang cenderung lembab adalah kondisi yang optimal untuk perkecambahan biji. Jika kondisi lembab/musim hujan anakan tanaman sarang semut akan banyak dijumpai disekitar induk. Tapi saat musim kemarau jarang ditemui anakan bahkan tanaman dewasa juga lambat tumbuh dan berbunga.

Oleh karena itu dibutuhkan suatu metode perbanyak tanaman untuk dapat mengatasi permasalahan tersebut. Salah satu metode yang dapat digunakan adalah teknik kultur jaringan (*in vitro*). Kultur jaringan adalah suatu metode untuk mengisolasi bagian dari tanaman seperti protoplasma, sel, jaringan dan organ, serta menumbuhkannya dalam kondisi aseptik, sehingga bagian-

bagian tersebut dapat memperbanyak diri dan beregenerasi menjadi tumbuhan utuh kembali. Teknik kultur jaringan dapat menghasilkan tanaman sarang semut dalam jumlah yang banyak dan dalam waktu yang relatif singkat. Informasi tentang budi daya tanaman sarang semut dengan menggunakan metode kultur jaringan saat ini masih belum banyak dilaporkan. Oleh sebab itu peluang memperbanyak tanaman ini dengan menggunakan metode tersebut masih sangat besar.

6.2 Teknik Kultur Jaringan

Kultur jaringan dalam bahasa asing disebut sebagai *tissue culture*, *weefsel cultuus* atau *gewebe kultur*. Kultur adalah budidaya dan jaringan adalah sekelompok sel yang mempunyai bentuk dan fungsi yang sama. Maka, kultur jaringan berarti membudidayakan suatu jaringan tumbuhan menjadi tumbuhan kecil yang mempunyai sifat seperti induknya.

Teknik kultur jaringan tumbuhan bermula dari pembuktian sifat totipotensi sel, yaitu bahwa setiap sel tumbuhan yang hidup dilengkapi dengan informasi genetik dan perangkat fisiologis yang lengkap untuk tumbuh dan berkembang menjadi tumbuhan utuh, jika kondisinya sesuai. Teknik kultur jaringan tumbuhan sangat potensial untuk program pemuliaan tumbuhan. Dibandingkan dengan memperbanyak tumbuhan secara konvensional, memperbanyak tumbuhan secara kultur jaringan mempunyai kelebihan yaitu dapat memperbanyak tumbuhan tertentu yang sulit atau sangat lambat diperbanyak secara konvensional, ditumbuhkan dalam waktu relatif singkat sehingga lebih ekonomis.

Beberapa faktor yang mempengaruhi keberhasilan kultur jaringan adalah media tanam, zat pengatur tumbuh (zpt), sumber eksplan yang digunakan dan faktor lingkungan. ZPT merupakan senyawa organik bukan hara yang dalam konsentrasi rendah dapat menstimulir atau memacu pertumbuhan dan dalam konsentrasi tinggi dapat menghambat atau mengganggu proses fisiologis tumbuhan. Bila tidak ditambahkan ke dalam medium kultur jaringan pertumbuhan tumbuhan atau eksplan dapat terhambat, bahkan mungkin tidak tumbuh sama sekali. Zat pengatur tumbuh dibagi menjadi 5 kelompok yaitu auksin, sitokinin, giberelin, asam absisat dan etilen. Zat pengatur tumbuh memegang peranan

penting dalam pertumbuhan dan perkembangan kultur. Zat pengatur tumbuh yang sering digunakan dalam kultur jaringan adalah auksin, sitokinin dan giberelin.

Auksin merupakan zat pengatur tumbuh yang sering digunakan dalam kultur jaringan, terutama untuk pertumbuhan kalus dan pertumbuhan akar.. Pada pemberian auksin dengan kadar relatif tinggi, diferensiasi kalus cenderung ke arah pembentukan primordia akar, sedangkan pemberian sitokinin dengan kadar yang relatif tinggi menyebabkan diferensiasi kalus akan cenderung ke arah pembentukan primordia batang atau tunas. Dengan demikian macam dan komposisi penggunaan ZPT pada medium kultur jaringan penting sekali untuk diperhatikan (sangat bergantung pada jenis tumbuhannya). Auksin adalah sekelompok senyawa yang fungsinya merangsang pemanjangan sel-sel pucuk yang spektrum aktivitasnya menyerupai IAA. Pada umumnya auksin meningkatkan pemanjangan sel, pembelahan sel dan pembentukan akar adventif. Dalam pembentukan akar pada tunas jenis auksin yang seringkali digunakan adalah IBA dan NAA, karena efektivitasnya tinggi dan harganya relatif murah.

Sitokinin merupakan zat pengatur tumbuh yang mendorong pembelahan (sitokinesis). Beberapa macam sitokinin merupakan sitokinin alami (kinetin, zeatin). Sitokinin alami dihasilkan pada jaringan yang tumbuh aktif terutama pada akar, embrio dan buah. Sitokinin yang diproduksi di akar selanjutnya diangkut oleh xilem menuju sel-sel target pada batang. Sitokinin juga dapat meningkatkan pembelahan, pertumbuhan dan perkembangan kultur sel tumbuhan. Jenis sitokinin yang sering ditambahkan dalam medium antara lain adalah: kinetin, zeatin dan BAP.

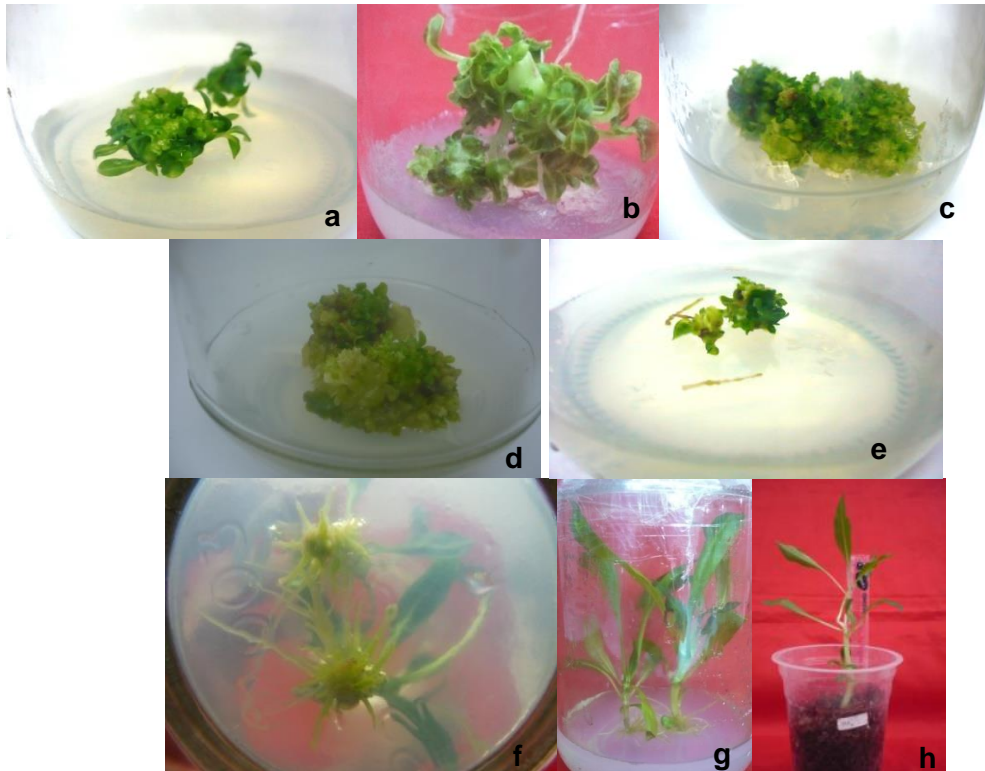
Giberelin bukan merupakan zat pengatur tumbuh yang esensial. Penggunaannya hanya pada jenis-jenis tumbuhan tertentu saja. Giberelin biasanya digunakan untuk memecahkan dormansi embrio atau biji. Giberelin yang umum digunakan adalah G₃. Fungsi utama Giberelin adalah mendorong perkembangan biji, perkembangan kuncup, pemanjangan batang dan pertumbuhan daun, mendorong pembungaan dan perkembangan buah, mempengaruhi pertumbuhan dan diferensiasi akar.

Eksplan merupakan bagian tanaman yang digunakan sebagai bahan awal untuk memperbanyak tanaman dalam kultur jaringan. Faktor penentu keberhasilan

eksplan tergantung pada umur fisiologis, umur ontogenetik, ukuran eksplan, serta bagian tanaman yang diambil merupakan hal-hal yang harus dipertimbangkan dalam memilih eksplan yang akan digunakan. Umumnya, bagian tanaman yang digunakan sebagai eksplan adalah jaringan muda yang sedang aktif. Jaringan tanaman yang masih muda mempunyai daya regenerasi lebih tinggi, karena sel-selnya masih aktif membelah diri dan relatif lebih bersih. Bagian tanaman yang dapat digunakan sebagai eksplan diantaranya adalah biji, potongan akar, potongan daun dan lain lain.

Bentuk eksplan lain yang dapat digunakan adalah kalus. Kalus adalah massa sel yang tak terdiferensiasi, yang dibentuk oleh sel-sel tanaman yang aktif membelah dan biasanya terjadi di tempat irisan untuk menutupi luka dalam media. Kultur jaringan tumbuhan yang sering digunakan dalam produksi metabolit sekunder adalah kultur kalus dan kultur suspensi sel. Kultur kalus dan kultur sel tumbuhan secara *in vitro* adalah sumber yang potensial untuk produksi metabolit sekunder.

Perbanyakan tanaman sarang semut sudah pernah dilakukan walau informasinya masih sedikit. Menurut Sudrajat dan Widodo (2014) yang telah melakukan budidaya tanaman *M. pendens* dengan metode kultur jaringan, untuk inisiasi tunas terbaik didapatkan pada penambahan Kinetin 6 mg/l yaitu 5 tunas dan jumlah akar terbanyak yaitu 10 akar. Sudrajat (2012) yang menggunakan sumber eksplan tunas pucuk mendapatkan pertumbuhan tunas sarang semut (*M. pendens*) terbaik diperoleh pada media MS yang diperkaya dengan zat pengatur tumbuh IBA dan BAP 4 mg/l dengan waktu muncul tunas pada hari ke 6, jumlah daun dan akar masing-masing 2 dan panjang akar 4 mm, tapi belum berhasil untuk multiplikasi tanaman. Sari et al., (2016) telah berhasil memperbanyak tanaman sarang semut (*M. tuberosa*) dengan menggunakan berbagai sumber eksplan seperti kotiledon, batang, umbi, nodus dan akar secara *in vitro*. Jumlah tunas yang dihasilkan bervariasi dari masing-masing sumber eksplan yaitu berkisar 10-80 tunas.



Gambar 15. Budidaya tanaman sarang semut (*M. tuberosa*) secara in vitro dengan berbagai sumber eksplan (a) batang (b) nodus (c) kotiledon (d) umbi (e) akar (f,g) Perakaran sarang semut (h) aklimatisasi sarang semut.

Tumbuhan sarang semut merupakan tumbuhan epifit yang hidup bersimbiosa dengan semut. Pada bagian dalam umbi terdapat domatia atau labirin yang dihuni oleh ratusan semut. Bagian umbi inilah yang sering digunakan sebagai obat. Jika tumbuhan sarang semut akan dibiakkan secara kultur jaringan maka perlu juga kajian yang mendalam tentang kandungan metabolit sekunder yang dihasilkan.

6.3 Kalus sebagai Sumber Metabolit Sekunder Secara *In Vitro*

Selain untuk budidaya tanaman, kultur jaringan juga digunakan untuk memproduksi metabolit sekunder tanaman. Kultur jaringan mempunyai manfaat besar di bidang farmasi karena dari usaha ini dapat menghasilkan metabolit sekunder sebagai bahan pembuatan obat-obatan.

Pada umumnya untuk mempelajari sintesis metabolit sekunder secara kultur jaringan yang sering digunakan adalah kultur organ, kultur suspensi sel dan kultur kalus. Kultur yang lebih berpotensi untuk digunakan dalam produksi

metabolit sekunder adalah kultur suspensi sel dan kultur kalus. Kultur kalus adalah massa sel yang tidak terdiferensiasi, terdiri dari sel parenkim yang muncul dari sel jaringan induk yang sedang membelah dan biasanya terjadi di tempat irisan untuk menutupi luka dalam media. Pengembangbiakan massal melalui kultur jaringan tak mempengaruhi kandungan senyawa aktif sebuah tanaman. Syaratnya dalam budidaya harus dikondisikan (suhu, iklim, intensitas cahaya, nutrisi) seperti habitat aslinya.

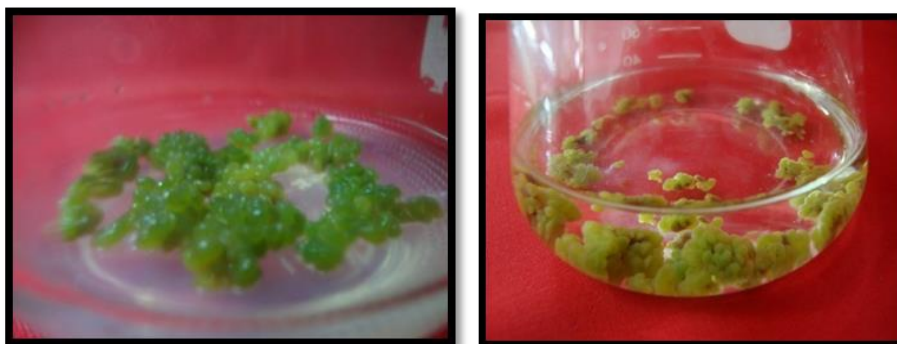
Kultur kalus adalah membiakkan sekelompok sel yang berasal dari jaringan tanaman yang tumbuh dalam medium hara. Medium tersebut terbuat dari garam anorganik, sumber karbon (biasanya sukrosa), auksin dan sitokinin. Komposisi medium merupakan hal yang penting bagi masing-masing spesies yang dibiakkan. Untuk menghasilkan kalus yang baik, zat hara berperan merangsang pertumbuhan sel dengan cepat. Beberapa jaringan tanaman dapat digunakan untuk membentuk biakan kalus seperti akar, batang, daun, meristem dan anther. Namun demikian, untuk spesies-spesies tertentu dari salah satu jenis kalusnya dapat menghasilkan kalus yang lebih baik dari yang lainnya.

Untuk membentuk kalus, jaringan dipisahkan dari tanaman dan permukaan sayatan disterilkan untuk membunuh bakteri atau jamur yang dapat mengkontaminasi biakan. Beberapa peneliti mampu membentuk kalus dari tanaman yang tumbuh dalam kondisi aseptik dengan permukaan biji yang disterilisasi untuk mengurangi permasalahan kontaminasi mikroorganisme. Jaringan yang diisolasi tersebut ditumbuhkan dalam medium steril pada suhu 20-25°C dan diberikan cahaya yang cukup. Apabila keseimbangan ZPT tepat, maka kalus akan segera terbentuk. Perkembangan kalus dikendalikan oleh hormon yang ditambahkan ke dalam medium, khususnya auksin dan sitokinin. Perubahan kadar hormon dapat mempengaruhi kalus apakah akan membentuk tunas atau akar. Keseimbangan hormon yang diperlukan merupakan hal penting untuk setiap spesies dan sering sangat beragam antara kultivar yang satu dengan yang lain. Salah satu auksin yang berguna dalam pembentukan dan merangsang produksi kalus adalah 2,4-D yang merupakan zpt sintetik.

Keuntungan produksi metabolit sekunder melalui kultur jaringan tumbuhan adalah sebagai berikut:

- a. Melalui kultur jaringan tumbuhan dapat dibentuk senyawa yang bermanfaat dalam kondisi terkontrol dan dalam waktu yang relatif lebih singkat.
- b. Sel-sel tumbuhan dapat diperbanyak dengan mudah untuk memperoleh metabolit tertentu.
- c. Pertumbuhan sel secara otomatis terawasi dan proses metabolisme dapat diatur secara rasional.
- d. Hasil produksi yang diperoleh lebih konsisten, baik dalam kualitas maupun kuantitas, karena kondisi lingkungannya dapat diatur.
- e. Melalui kultur jaringan tumbuhan dapat dibentuk senyawa baru yang tidak terdapat dalam tanaman induknya dan senyawa baru ini mungkin berguna untuk dikembangkan atau dimanfaatkan lebih jauh.
- f. Kultur tidak bergantung pada kondisi lingkungan seperti keadaan geografis, iklim, musim dan tidak memerlukan lahan yang luas.

Sari dan Kusuma (2015) telah berhasil menumbuhkan kalus sarang semut pada media Murashige and Skoog (MS) padat dan cair yang diberi penambahan zat pengatur tumbuh 2,4 *Dichlorophenoxyacetic acid* dan Kinetin. Kalus yang dihasilkan bersifat remah dan berwarna hijau. Kalus dapat digunakan sebagai sumber senyawa metabolit sekunder pengganti bahan dari alam. Dengan menggunakan kalus, pemakaian bagian tumbuhan dari alam sebagai bahan fitofarmaka dapat dikurangi. Hal ini juga berpengaruh positif terhadap konservasi dan pelestarian plasma nutfah tumbuhan apalagi terhadap tumbuhan yang terancam punah.



Gambar 16. Kalus Tanaman Sarang Semut (*M. tuberosa*) pada
a. media MS Padat b. media MS cair

Daftar Referensi

- Ahmad, R; E. N. M. Mahbob; Z. M. Noo; N. H. Ismail; N. H Lajis and K. Shaari. 2010. Evaluation of Antioxidant Potential of Medicinal Plants from Malaysian Rubiaceae (Subfamily Rubioideae). *African Journal of Biotechnology*. 9 (46): 7948-7954.
- Anonim. 2008. Peranan Zat Pengatur Tumbuh Dalam Pertumbuhan dan Perkembangan Tumbuhan. <http://iel.ipb.ac.id>. Diakses tanggal 11 Agustus 2010.
- Anonim. 2009^a. Myrmecodia Ant Plant. <http://dc131.4shared.com/img/120063054/6654d93c/Myrmecodia.pdf>.diakses tanggal 8 Maret 2011.
- Anonim. 2009^b. Habitat Sarang Semut. <http://rumahsemut.co.cc/habitat-sarang-semut>. Diakses pada tanggal 1 Desember 2010.
- Ariani, S.R.D., Irianto, H., Malikhah, I. 2014. Optimasi Lama Waktu Ekstraksi Guna Menghasilkan Ekstrak Herba Sarang Semut (*Myrmecodia Pendans* Merr. & Perry) dari Kalteng dengan Aktivitas Antioksidan Tertinggi Disertai Skrining Senyawa Bahan Alam, Seminar Nasional Kimia dan Pendidikan Kimia VI.
- Brooks, G. F., Butel, J.S., Morse, S.A. 2005. *Mikrobiologi Kedokteran Jawetz, Melnick & Adelberg*. Diterjemahkan oleh Hartanto, H., Rachman, C., Dimanti, A., Diani, A., Edisi 23, Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta. Hal 62-71.
- Crisaningtyas, F. Dan Rachmadi, A.T. 2010. Pemanfaatan Sarang Semut (*Myrmecodia pendens*) Asal Kalimantan Selatan Sebagai Antibakteri, *Jurnal Riset Industri Hasil Hutan*, Volume 2, Nomor 2, 31-35.
- Djide dan Sartini. 2008. *Dasar-Dasar Mikrobiologi Farmasi*. Lepas. Makasar.
- Dominika dan Dewi, Y.S.K. 2008. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Fenol Umbi Sarang Semut (*Hydnophytum sp.*) Pada Berbagai Suhu Penyeduhan, *Agritech*, Volume 28, Nomor 2. 91-96.
- Entjang, I. 2003. *Mikrobiologi dan Parasitologi untuk Akademi Keperawatan dan Sekolah Tenaga Kesehatan yang Sederajat*. PT. Citra Aditya Bakti. Bandung.
- George, E. F. and P. D. Sherrington. 1984. *Plant Propagation by Tissue Culture (Handbook and Directory of Commercial Laboratories)*. Eastern Press. England.
- Gunawan L.W. 1995. *Teknik Kultur In Vitro dalam Hortikultura*. Penebar Swadaya, Jakarta.
- Gunawan, Suyanto dan Hafizianor. 2009. Inventarisasi Komposisi Jenis dan Potensi Tumbuhan Sarang Semut (*Myrmecodia sp.*) Berdasarkan Karakteristik Ekologis Habitatnya di Kawasan Hutan Pengunungan Meratus Kalimantan Timur. <http://tehtiproduk.files.wordpress.com>.Diakses tanggal 22 Mei 2010.
- Harmita dan M. Radji. 2008. *Buku Ajar Analisa Hayati Edisi 3*. EGC. Jakarta.
- Harborne, J.B. 1989. General Procedures and Measurement of Total Phenolics dalam *Methods in Plant Biochemistry*, (Dey, P.M. dan Harborne, J.B., Editor), Volume 1, Academic Press. London.
- Hartanto, H. 2006. *Konsep Dasar Farmakologi: Panduan Untuk Mahasiswa Edisi 3*. EGC. Jakarta.
- Hasudungan, F. 2008. Ekosistem Laguna Teluk Belukar Serta Ospek Sosial Ekonomi Masyarakat di Desa Teluk Belukar Kecamatan Gunung Sitoli Utara, Kabupaten Nias Provinsi Sumatera Utara. *Wetlands Internasional, Indonesia Programme*. Bogor.

- Hendaryono, D. P. S dan A. Wijayani. 1994. Teknik Kultur Jaringan. Kanisius. Jakarta.
- Hendra. 2008. Tentang Sarang Semut. <http://iqraherba.blogspot.com/2008/08>. Diakses tanggal 3 November 2011.
- Huxley, C. R and M. H. P. Jebb. 1993. The Tuberos Ephypt from Rubiaceae 5: A Revision *Myrmecodia*. *Blumea* 37:271-334
- Hostettmann, K. Dan Marston, A. 2006. Separation and Quantification of Flavonoids dalam Flavonoid, Chemistry, Biochemistry and Applications, (Andersen, Q.M. dan Markham, K.R., Editor). CRC Press. New York.
- Hertiani, T., Ediati, S., Saad, S. & Ulfah, M. 2010. Preliminary Study on Immunomodulatory Effect of Sarang-Semut Tubers *Myrmecodia tuberosa* and *Myrmecodia pendens*, *OJBS*10(3): 136-141.
- Jawetz, E., Melnick, J. L., dan Adelberg, E. A. 1996. *Mikrobiologi Kedokteran Edisi 20*. EGC. Jakarta.
- Krishnamoorthy, H. N. 1981. Plant Growth Substances. Including Applications in Agriculture. Mc. Graw-Hill Offices. New Delhi.
- Lay, B. 1994. *Analisis Mikroba di Laboratorium*. PT Raja Grafindo Persada. Jakarta.
- Lisdawati, V., S. Wiryowidagdo., L. B. S. Kardono. 2006. *Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) dari Berbagai Fraksi Ekstrak Daging Buah dan Kulit Biji Mahkota Dewa (Phaleria marcocarpa)* Panel Kesehatan Volume 34 (3).
- Manoi, F. 2008. *Sarang Semut (Myrmecodia) Tanaman Obat Berpotensi Menyembuhkan Berbagai Penyakit*. Warta Penelitian dan Pengembangan Tanaman Industri. Bogor.
- Manthell, S. H and Smith. 1983. Cultural Factor that Influence Secondary Metabolites Accumulation in Plant Cell & Tissue Culture. In: Plant Biotechnology. Mantell S. H. & Smith (eds). Cambridge Univ. Press. Cambridge.
- Mardany, M.P., Chrystomo, L.Y., Karim, A.K. 2016. Skrining Fitokimia dan Uji Sitotoksik dari Tumbuhan Sarang Semut (*Myrmecodia beccarii* Hook.f.) Asal Kabupaten Merauke. *Jurnal Biologi Papua* Volume 8, Nomor 1, 13-22.
- Markom, M; M. Hasan; W. R. W. Daud; H. Singh and J. M. Jamin. 2007. Extraction of Hydrolysible Tannins from *Phyllanthus niruri* Linn: Effect of Solvents and Extraction Methods. Department of Chemical Engineering. Malaya University and Department of Chemical and Process Engineering. Kebangsaan Malaysia University. *Journal of Separation and Purification Technology*. 52: 487-496.
- McLaughlin, R. L. 1998. The Use of Biological Assays to Evaluate Botanical. *Drugs Informations Journal*. Volume 32 : 513-524.
- Meilani, S. W. 2006. *Uji Bioaktivitas Zat Ekstraktif Kayu Suren (Toona surena Merr.) dan Ki Bonteng (Plantae latifolia BL.) Menggunakan Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)*. Fakultas Kehutanan. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Meilisa. 2008. Uji Aktivitas Anti Bakteri dan Formulasi Dalam Sediaan Kapsul Dari Ekstrak Etanol Rimpang Tumbuhan Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*, Roxb) Terhadap Beberapa Bakteri. Radji, M. 2011. *Mikrobiologi*. Buku Kedokteran ECG. Jakarta.
- Mogea, J. P dan J. R. Welsh. 1991. Dasar-dasar Genetika dan Pemuliaan Tanaman (Terjemahan). Erlangga. Jakarta.
- Mudjiman. 1983. *Udang Renik Air Asin (Artemia salina)*. Bhatara. Jakarta.

- Murti, Y. B. 2006. Isolation and Structure Elucidation of Bioactive Secondary Metabolites from Sponges Collected at Ujung Pandang and in the Bali Sea, Indonesia. Dissertation Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Dusseldorf.
- Pelczar, M.J dan E.C.S Chan. 2007. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Diterjemahkan oleh Ratna Siri hadioetomo *et al.*, Universitas Indonesia Press. Jakarta.
- Todar, K. (1998) *Bacteriology 330 Lecture Topics: Staphylococcus*. Kenneth Todar University of Wisconsin Department of Bacteriology, Wisconsin. USA.
- Pierik, R.L.M. 1987. *In Vitro Culture of Higher Plants*. Martinus Nijhoff Publisher. Lancaster.
- Prachayasittikul, S., Buraparuangsang P., Worachartcheewan, A., Isarankura-NaAyudhya, C., Ruchirawat, S., & Prachayasittikul, V., 2008, Antimicrobial and Antioxidative Activities of Bioactive Constituents from *Hydnophytum formicarum* Non Jack Bl., *Molecules*, 13, 904-921.
- Peraturan Menteri Kehutanan Nomor: P.35 (2007). Tentang Hasil Hutan Bukan Kayu. http://www.dephut.go.id/INFORMASI/web_HHBK/permen_p_35.pdf. diakses 10 desember 2011.
- Pratiwi, S.T. 2008. *Mikrobiologi Farmasi*. Erlangga. Jakarta.
- Prachayasittikul S., P. Buraparuangsang., A. Worachartcheewan., C. Isarankura-Na-Ayudhya, S. Ruchirawat and V. Prachayasittikul. 2008. Antimicrobial and Antioxidative Activities of Bioactive Constituents from *Hydnophytum formicarum* Jack. *Journal Molecules*. ISSN 1420-3049. 13:904-921.
- Ríos, J.L, & Recio, M.C. 2005. Perspective paper, Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 100, 80-84.
- Robinson, T. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. ITB. Bandung.
- Rothwell, J., Morand, C., Manach, C. 2012. Bioavailability of Flavanones dalam Flavonoids and Related Compounds, Bioavailability and Function, (Spencer, J.P.E dan Crozier, A., Editor), CRC Press. New York.
- Salisbury, F.B. dan C. W. Ross. 1995. *Fisiologi Tumbuhan*. Jilid 3. (diterjemahkan oleh Diah R.L dan Sumaryono). ITB. Bandung.
- Sarma, J. C. 2011. Naturally Occurring Polyphenols and Their Utility dalam Chemistry of Phenolic Compounds, State of the Art, (Baruah, J.B., Editor). *Nova Science Publisher*. New York.
- Sari, Y. P., W. Kustiawan, S. Sukartiningsih, and A. Ruchaemi. 2017. The potential of secondary metabolites of *Myrmecodia tuberosa* from different host trees. *Nusantara Bioscience* 9: 170-174.
- Sari, Y.P., W. Kustiawan, Sukartiningsih dan A. Ruchaemi. 2016. Micropropagation of *Myrmecodia tuberosa* Jack.:A Medicinal Plant From Borneo. *International Journal Of Scientific & Technology Research* Volume 5, Issue 09. Issn 2277-8616 224.
- Sari, Y. P., and R. Kusuma. 2015. Modifikasi konsentrasi sukrosa pada media padat dan cair untuk pertumbuhan kalus tanaman sarang semut (*Myrmecodia tuberosa* jack.) secara *in vitro*. *Bio Wallacea Jurnal Ilmiah Ilmu Biologi* 1: 9-13.
- Soeksmanto, A., P. Simanjuntak., M. A. Subroto. 2010. Uji Toksisitas Akut Ekstrak Air Tanaman Sarang Semut (*Myrmecodia pendans*) Terhadap Histologi Organ Hati Mencit. *Jurnal Natur Indonesia* Volume 12 (2).
- Subroto, M. A dan Saputro, H. 2008. *Gempur Penyakit dengan Sarang Semut*. Jakarta. Penebar Swadaya.

- Subroto, A. 2009. *Obat Alternatif: Sarang Semut Penakluk Penyakit Maut*, <http://herbaljawa.blogspot.com/2009/07/Obat-alternatif-sarang-semut-penakluk-penyakit-maut.html>. Diakses hari Sabtu, 20 Juli 2016, pukul 22.21 WITA di Samarinda.
- Sudrajad, H. 2012. Upaya Pembibitan Biji Sarang Semut (*Myrmecodiapendans*) dengan Kultur Jaringan. *Agriekonomika* 1(1):47-51. ISSN2301 – 9948. e ISSN 2407 – 6260.
- Sudrajad, H dan H. Widodo. 2014. Kultur Jaringan Tanaman Sarang Semut (*M. pendans*). *Prosiding Seminar Nasional Biodiversitas*. Jurusan Biologi. FMIPA-UNS. 3(2): 67-70.
- Supriatno. 2014. Antitumor activity of Papua's *Myrmecodia pendans* in Human Oral Tongue Squamous Cell Carcinoma Cell Line Through Induction of Cyclin-dependent Kinase Inhibitor p27Kip1 and Suppression of Cyclin E. *Journal of Cancer Research & Therapy* 2 (3): 48-53
- Suryowinoto, M. 1996. *Pemuliaan Tanaman Secara In Vitro*. Kanisius. Yogyakarta
- Tabata, M. 1977. Recent Advances in The Production of Medical Substances by Plant Cell Cultures. In: Barz; Reinhard and Zenk (eds). *Plant Tissue Culture and Its Biotechnological Application*. pp 3-16. Springer-Verlag. New York.
- Wattimena, G. A. 1992. *Bioteknologi Tanaman*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Pusat Antar Universitas Bioteknologi. IPB. Bogor.
- Weinreb, O., Amit, T., Youdim, M.B.H., Mandel, S. 2012. Green Tea Flavan-3-ol and Their Role in Protecting Against Alzheimer's and Parkinson's Disease Pathophysiology dalam *Flavonoids and Related Compounds. Bioavailability and Function*. (Spencer, J.P.E dan Crozier, A., Editor). CRC Press. New York.
- Yusnita, 2003. *Kultur Jaringan Cara Memperbanyak Tanaman Secara Efisien*. Agromedia Pustaka. Bogor.
- Zulkarnain. 2009. *Kultur Jaringan Tanaman*. Bumi Aksara. Jakarta.

4. Produk Penelitian Kalus Tanaman Sarang Semut





KONTRAK PENELITIAN
PENELITIAN DASAR UNGGULAN PERGURUAN TINGGI
Tahun Anggaran 2018
Nomor: 071/UN17.41/KL/2018

Pada hari ini Senin tanggal Lima bulan Februari tahun Dua Ribu Delapan Belas, kami yang bertandatangan dibawah ini :

- 1. SUSILO** : Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat, Universitas Mulawarman, dalam hal ini bertindak untuk dan atas nama Universitas Mulawarman, yang berkedudukan di Jalan Kerayan no. 1 Kampus Gn. Kelua Samarinda, untuk selanjutnya disebut **PIHAK PERTAMA**;
- 2. YANTI PUSPITA SARI** : Dosen Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Mulawarman, dalam hal ini bertindak sebagai pengusul dan Ketua Pelaksana Penelitian Tahun Anggaran 2018 untuk selanjutnya disebut **PIHAK KEDUA**.

PIHAK PERTAMA dan **PIHAK KEDUA**, secara bersama-sama sepakat mengikatkan diri dalam suatu Kontrak PENELITIAN DASAR UNGGULAN PERGURUAN TINGGI Tahun Anggaran 2018 dengan ketentuan dan syarat-syarat sebagai berikut:

Pasal 1
Ruang Lingkup Kontrak

PIHAK PERTAMA memberi pekerjaan kepada **PIHAK KEDUA** dan **PIHAK KEDUA** menerima pekerjaan tersebut dari **PIHAK PERTAMA**, untuk melaksanakan dan menyelesaikan PENELITIAN DASAR UNGGULAN PERGURUAN TINGGI Tahun Anggaran 2018 dengan judul "Potensi Ekstrak Kalus Tanaman Sarang Semut (*Myrmecodia tuberosa* Jack) Hasil In Vitro Sebagai Antioksidan Dan Antimikroba".

Pasal 2
Dana Penelitian

- (1) Besarnya dana untuk melaksanakan penelitian dengan judul sebagaimana dimaksud pada Pasal 1 adalah sebesar **Rp. 135.000.000 (Seratus Tiga Puluh Lima Juta Rupiah)** sudah termasuk pajak.
- (2) Dana Penelitian sebagaimana dimaksud pada ayat (1) dibebankan pada Daftar Isian Pelaksanaan Anggaran (DIPA) Direktorat Jenderal Penguatan Riset dan Pengembangan, Kementerian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi Nomor SP DIPA-042.06.1.401516/2018, tanggal 05 Desember 2017.

Pasal 3
Tata Cara Pembayaran Dana Penelitian

- (1) **PIHAK PERTAMA** akan membayarkan Dana Penelitian kepada **PIHAK KEDUA** secara bertahap dengan ketentuan sebagai berikut:
 - a. Pembayaran Tahap Pertama sebesar 70% dari total dana penelitian yaitu $70\% \times \text{Rp. } 135.000.000 = \text{Rp. } 94.500.000$ (*Sembilan Puluh Empat Juta Lima Ratus Ribu Rupiah*), yang akan dibayarkan oleh **PIHAK PERTAMA** setelah **PIHAK KEDUA** melengkapi proposal penelitian yang memuat judul penelitian, pendekatan dan metode penelitian yang digunakan, data yang akan diperoleh, anggaran yang akan digunakan, dan tujuan penelitian berupa luaran yang akan dicapai.
 - b. Pembayaran Tahap Kedua sebesar 30% dari total dana penelitian yaitu $30\% \times \text{Rp. } 135.000.000 = \text{Rp. } 40.500.000$ (*Empat Puluh Juta Lima Ratus Ribu Rupiah*), dibayarkan oleh **PIHAK PERTAMA** kepada **PIHAK KEDUA** setelah **PIHAK KEDUA** mengunggah ke SIMLITABMAS yaitu Laporan Kemajuan Pelaksanaan Penelitian, Catatan Harian 70% dan Surat Pernyataan Tanggungjawab Belanja (SPTJB) atas seluruh dana yang telah ditetapkan (100%).
 - c. Biaya tambahan dibayarkan kepada **PIHAK KEDUA** bersamaan dengan pembayaran Tahap Kedua dengan melampirkan Daftar luaran penelitian yang sudah divalidasi oleh **PIHAK PERTAMA**.
- (2) Dana Penelitian sebagaimana dimaksud pada ayat (1) akan disalurkan oleh **PIHAK PERTAMA** kepada **PIHAK KEDUA** ke rekening sebagai berikut:

Nama	:	YANTI PUSPITA SARI
NomorRekening	:	0216507006
Nama Bank	:	BNI

- (3) **PIHAK PERTAMA** tidak bertanggung jawab atas keterlambatan dan/atau tidak terbayarnya sejumlah dana sebagaimana dimaksud pada ayat (1) yang disebabkan karena kesalahan **PIHAK KEDUA** dalam menyampaikan data peneliti, nama bank, nomor rekening, dan persyaratan lainnya yang tidak sesuai dengan ketentuan.

Pasal 4
Jangka Waktu

Jangka waktu pelaksanaan penelitian sebagaimana dimaksud dalam Pasal 1 sampai selesai 100%, adalah terhitung sejak **Tanggal 05 Februari 2018** dan berakhir pada **Tanggal 09 NOVEMBER 2018**.

Pasal 5
Target Luaran

- (1) **PIHAK KEDUA** berkewajiban untuk mencapai target luaran wajib penelitian berupa Publikasi internasional bereputasi (accepted/published).
- (2) **PIHAK KEDUA** diharapkan dapat mencapai target luaran tambahan penelitian berupa Teknologi Tepat Guna (Product) dan Buku ajar (published).
- (3) **PIHAK KEDUA** berkewajiban untuk melaporkan perkembangan pencapaian target luaran sebagaimana dimaksud pada ayat (1) kepada **PIHAK PERTAMA**.
- (4) **PIHAK KEDUA** bertanggung jawab sepenuhnya terhadap kebenaran data luaran yang disebutkan dalam kontrak penelitian ini.

Pasal 6
Hak dan Kewajiban Para Pihak

- (1) Hak dan Kewajiban **PIHAK PERTAMA**:
 - a. **PIHAK PERTAMA** berhak untuk mendapatkan dari **PIHAK KEDUA** luaran penelitian sebagaimana dimaksud dalam Pasal 5;
 - b. **PIHAK PERTAMA** berkewajiban untuk memberikan dana penelitian kepada **PIHAK KEDUA** dengan jumlah sebagaimana dimaksud dalam Pasal 2 ayat (1) dan dengan tata cara pembayaran sebagaimana dimaksud dalam Pasal 3.
- (2) Hak dan Kewajiban **PIHAK KEDUA**:
 - a. **PIHAK KEDUA** berhak menerima dana penelitian dari **PIHAK PERTAMA** dengan jumlah sebagaimana dimaksud dalam Pasal 2 ayat (1);
 - b. **PIHAK KEDUA** berkewajiban menyerahkan kepada **PIHAK PERTAMA** Luaran PENELITIAN DASAR UNGGULAN PERGURUAN TINGGI dengan judul Potensi Ekstrak Kalus Tanaman Sarang Semut (*Myrmecodia tuberosa* Jack) Hasil In Vitro Sebagai Antioksidan Dan Antimikroba dan **Surat Pernyataan Tanggungjawab Belanja (SPTJB) 100%**;
 - c. **PIHAK KEDUA** berkewajiban untuk bertanggungjawab sepenuhnya dalam penggunaan dana penelitian yang diterimanya sesuai dengan proposal kegiatan yang telah disetujui;

Pasal 7
Laporan Pelaksanaan Penelitian

- (1) **PIHAK KEDUA** berkewajiban untuk menyampaikan kepada **PIHAK PERTAMA** berupa:
 - a. **Laporan Kemajuan** sebanyak **3 (tiga)** eksemplar;
 - b. **Laporan akhir** sebanyak **4 (empat)** eksemplar;
 - c. **Poster** ukuran 70 x 70 cm (mengikuti template dikti) sebanyak **1 (satu)** buah;
 - d. **Artikel Ilmiah** sebanyak **1 (satu)** eksemplar;
 - e. **Template profil** sebanyak **1 (satu)** eksemplar;
 - f. **Rekapitulasi penggunaan anggaran** (melampirkan bukti setor pajak yang telah dibayarkan) sesuai dengan jumlah dana yang telah ditetapkan
 - g. CD yang berisi pont a s.d. g sebanyak 1 (satu) buah.
- (2) **PIHAK KEDUA** berkewajiban mengunggah **Laporan Kemajuan** dan **Catatan harian penelitian 70 %** dan **SPTJB 100%** ke SIMLITABMAS paling lambat **31 Agustus 2018**.
- (3) **PIHAK KEDUA** berkewajiban menyerahkan *Hardcopy* Laporan Kemajuan dan Rekapitulasi Penggunaan Anggaran 70% kepada **PIHAK PERTAMA**, paling lambat **7 September 2018**
- (4) **PIHAK KEDUA** berkewajiban mengunggah Catatan Harian 30 % Laporan komprehensif dan Laporan Akhir, capaian hasil, Poster, artikel ilmiah dan profil (bagi penelitian tahun terakhir) pada SIMLITABMAS paling lambat **09 November 2018**.
- (5) Laporan hasil Penelitian harus memenuhi ketentuan sebagai berikut:
 - a. Bentuk/ukuran kertas A4;
 - b. Laporan Akhir dijilid dalam bentuk **soft cover** sesuai warna yang telah ditetapkan;
 - c. Di bawah bagian cover ditulis:

Dibiayai oleh:

Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat
Direktorat Jenderal Penguatan Riset dan Pengembangan
Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi
Sesuai dengan Kontrak Penelitian
Nomor: 071/UN17.41/KL/2018

Pasal 8
Monitoring dan Evaluasi

PIHAK PERTAMA dalam rangka pengawasan akan melakukan Monitoring dan Evaluasi internal terhadap kemajuan pelaksanaan Penelitian Tahun Anggaran 2018 ini sebelum pelaksanaan Monitoring dan Evaluasi eksternal oleh Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat, Direktorat Jenderal Penguatan Riset dan Pengembangan, Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi.

Pasal 9
Penilaian Luaran

1. Penilaian luaran penelitian dilakukan oleh Komite Penilai/*Reviewer* Luaran sesuai dengan ketentuan yang berlaku.
2. Apa bila dalam penilaian luaran terdapat luaran tambahan yang tidak tercapai maka dana tambahan yang sudah diterima oleh peneliti harus disetorkan kembali ke kas negara.

Pasal 10
Perubahan Susunan Tim Pelaksana dan Substansi Pelaksanaan

Perubahan terhadap susunan tim pelaksana dan substansi pelaksanaan Penelitian ini dapat dibenarkan apabila telah mendapat persetujuan tertulis dari Direktur Riset dan Pengabdian Masyarakat, Direktorat Jenderal Penguatan Riset dan Pengembangan, Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi.

Pasal 11
Penggantian Ketua Pelaksana

- (1) Apabila **PIHAK KEDUA** selaku ketua pelaksana tidak dapat melaksanakan Penelitian ini, maka **PIHAK KEDUA** wajib mengusulkan pengganti ketua pelaksana yang merupakan salah satu anggota tim kepada **PIHAK PERTAMA**.
- (2) Apabila **PIHAK KEDUA** tidak dapat melaksanakan tugas dan tidak ada pengganti ketua sebagaimana dimaksud pada ayat (1), maka **PIHAK KEDUA** harus mengembalikan dana penelitian kepada **PIHAK PERTAMA** yang selanjutnya disetor ke Kas Negara.
- (3) Bukti setor sebagaimana dimaksud pada ayat (2) disimpan oleh **PIHAK PERTAMA**.

Pasal 12
Sanksi

- (1) Apabila sampai dengan batas waktu yang telah ditetapkan untuk melaksanakan Penelitian ini telah berakhir, namun **PIHAK KEDUA** belum menyelesaikan tugasnya, terlambat mengirim laporan Kemajuan, dan/atau terlambat mengirim laporan akhir, maka **PIHAK KEDUA** dikenakan sanksi administratif berupa penghentian pembayaran dan tidak dapat mengajukan proposal penelitian dalam kurun waktu dua tahun berturut-turut.
- (2) Apabila **PIHAK KEDUA** tidak dapat mencapai target luaran sebagaimana dimaksud dalam Pasal 5, maka kekurangan capaian target luaran tersebut akan dicatat sebagai hutang **PIHAK KEDUA** kepada **PIHAK PERTAMA** yang apabila tidak dapat dilunasi oleh **PIHAK KEDUA**, akan berdampak pada kesempatan **PIHAK KEDUA** untuk mendapatkan pendanaan penelitian atau hibah lainnya yang dikelola oleh **PIHAK PERTAMA**.

Pasal 13
Pembatalan Perjanjian

- (1) Apabila di kemudian hari terhadap judul Penelitian sebagaimana dimaksud dalam Pasal 1 ditemukan adanya duplikasi dengan Penelitian lain dan/atau ditemukan adanya ketidakjujuran, itikad tidak baik, dan/atau perbuatan yang tidak sesuai dengan kaidah ilmiah dari atau dilakukan oleh **PIHAK KEDUA**, maka perjanjian Penelitian ini dinyatakan batal dan **PIHAK KEDUA** wajib mengembalikan dana penelitian yang telah diterima kepada **PIHAK PERTAMA** yang selanjutnya akan disetor ke Kas Negara.
- (2) Bukti setor sebagaimana dimaksud pada ayat (1) disimpan oleh **PIHAK PERTAMA**.

Pasal 14
Pajak-Pajak

Hal-hal dan/atau segala sesuatu yang berkenaan dengan kewajiban pajak berupa PPN dan/atau PPh menjadi tanggung jawab **PIHAK KEDUA** dan harus dibayarkan oleh **PIHAK KEDUA** ke kantor pelayanan pajak setempat sesuai ketentuan yang berlaku.

Pasal 15
Peralatan dan/alat Hasil Penelitian

- (1) Hak Kekayaan Intelektual yang dihasilkan dari Pelaksanaan Penelitian diatur dan dikelola sesuai dengan peraturan dan perundang-undangan;
- (2) Setiap Publikasi, makalah dan/atau ekspos dalam bentuk apapun yang berkaitan dengan hasil penelitian ini wajib mencantumkan Direktorat Riset dan Pengabdian (DRPM) Kemenristekdikti sebagai pemberi dana;
- (3) Hasil Pelaksanaan Penelitian ini yang berupa peralatan dan/atau alat yang dibeli dari pelaksanaan Penelitian ini adalah milik Negara yang dapat dihibahkan kepada Universitas Mulawarman melalui Berita Acara Serah Terima (BAST).

Pasal 16
Penyelesaian Sengketa

Apabila terjadi perselisihan antara **PIHAK PERTAMA** dan **PIHAK KEDUA** dalam pelaksanaan perjanjian ini akan dilakukan penyelesaian secara musyawarah dan mufakat, dan apabila tidak tercapai penyelesaian secara musyawarah dan mufakat maka penyelesaian dilakukan melalui proses hukum

Pasal 17
Lain-lain

- (1) **PIHAK KEDUA** menjamin bahwa penelitian dengan judul tersebut di atas belum pernah dibiayai dan/atau diikutsertakan pada Pendanaan Penelitian lainnya, baik yang diselenggarakan oleh instansi, lembaga, perusahaan atau yayasan, baik di dalam maupun di luar negeri.
- (2) Segala sesuatu yang belum cukup diatur dalam Perjanjian ini dan dipandang perlu diatur lebih lanjut dan dilakukan perubahan oleh **PARA PIHAK**, maka perubahan-perubahannya akan diatur dalam perjanjian tambahan atau perubahan yang merupakan satu kesatuan dan bagian yang tidak terpisahkan dari Perjanjian ini.

Perjanjian ini dibuat dan ditandatangani oleh PARA PIHAK pada hari dan tanggal tersebut di atas, dibuat dalam rangkap 2 (dua) dan bermeterai cukup sesuai dengan ketentuan yang berlaku, yang masing-masing mempunyai kekuatan hukum yang sama.

PIHAK PERTAMA



Susilo
NIDN: 0005127103

PIHAK KEDUA

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Yanti Puspita Sari", is written over a horizontal line.

YANTI PUSPITA SARI
NIDN: 0004037404

Mengetahui
Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



IDRIS MANDANG
NIDN: 0008107105

**Kode>Nama Rumpun Ilmu: 113/Biologi (dan Bioteknologi Umum)
Bidang Fokus: Pengembangan Teknologi Kesehatan dan Obat**

**LAPORAN TAHUN TERAKHIR
PENELITIAN DASAR UNGGULAN PERGURUAN TINGGI**



**POTENSI EKSTRAK KALUS TANAMAN SARANG SEMUT
(*Myrmecodia tuberosa* Jack) HASIL *IN VITRO* SEBAGAI
ANTIOKSIDAN DAN ANTIMIKROBA**

Tahun ke 2 dari rencana 2 tahun

**Dr. YANTI PUSPITA SARI, M.Si: 0004037404 (Ketua)
EKO KUSUMAWATI, S.Si, MP: 0013048209 (Anggota)
Dr. CHAIRUL SALEH, M.Si: 0031037302 (Anggota)**

**UNIVERSITAS MULAWARMAN
NOVEMBER 2018**

**Dibiayai oleh:
Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat
Direktorat Jenderal Penguatan Riset dan Pengembangan
Kementerian Riset, Teknologi dan Perguruan Tinggi
Sesuai Dengan Kontrak Penelitian
Nomor: 071/UN17.41/KL/2018**

HALAMAN PENGESAHAN

Judul : POTENSI EKSTRAK KALUS TANAMAN SARANG SEMUT (*Myrmecodia tuberosa* Jack) HASIL IN VITRO SEBAGAI ANTIOKSIDAN DAN ANTIMIKROBA

Peneliti/Pelaksana
Nama Lengkap : Dr YANTI PUSPITA SARI, S.Si, M.Si
Perguruan Tinggi : Universitas Mulawarman
NIDN : 0004037404
Jabatan Fungsional : Lektor Kepala
Program Studi : Biologi
Nomor HP : 081253958381
Alamat surel (e-mail) : ypsman2002@yahoo.com

Anggota (1)
Nama Lengkap : EKO KUSUMAWATI S.Si, M.P
NIDN : 0013048209
Perguruan Tinggi : Universitas Mulawarman

Anggota (2)
Nama Lengkap : Dr. CHAIRUL SALEH
NIDN : 0031037302
Perguruan Tinggi : Universitas Mulawarman

Institusi Mitra (jika ada)
Nama Institusi Mitra : -
Alamat : -
Penanggung Jawab : -
Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 2 dari rencana 2 tahun
Biaya Tahun Berjalan : Rp 135.000.000
Biaya Keseluruhan : Rp 247.965.000

Mengetahui,
Dekan FMIPA UNMUL



(Dr. Eng. Idris Mandang, M.Si)
NIP/NIK 197110081998021001

Kota Samarinda, 8 - 11 - 2018
Ketua,



(Dr. YANTI PUSPITA SARI, S.Si, M.Si)
NIP/NIK 197403042000122001

Menyetujui,
Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat



(Prof. Dr. Susilo, M.Pd)
NIP/NIK 197105122002121002

RINGKASAN

Sarang semut (*Myrmecodia tuberosa* Jack.) merupakan tanaman obat asli Kalimantan yang berkhasiat menyembuhkan berbagai macam penyakit. Tanaman ini mengandung senyawa aktif penting seperti flavonoid, tanin, tokoferol, fenolik dan kaya berbagai mineral yang sangat berguna sebagai antioksidan dan anti kanker. Pemanfaatan tanaman secara besar-besaran dan terus menerus akan mengakibatkan kepunahan terhadap tanaman sarang semut jika tidak dilakukan tindakan untuk menanggulangnya. Oleh sebab itu perlu dilakukan usaha pelestarian melalui mekanisme pemuliaan dan pembudidayaan yaitu teknik kultur jaringan. Selain untuk budidaya tanaman, kultur jaringan juga digunakan untuk memproduksi dan meningkatkan kandungan metabolit sekunder tanaman sebagai bahan pembuatan obat-obatan. Untuk pengujian kandungan metabolit sekunder biasanya sumber eksplan yang digunakan adalah kultur kalus. Informasi ilmiah penggunaan ekstrak kalus metabolit sekunder dalam menghasilkan senyawa antioksidan (yang berpotensi sebagai antikanker) dan anti mikroba masih sangat kurang, biasanya sumber bahan baku selalu menggunakan langsung dari alam.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui ekstrak kalus tanaman sarang semut terbaik dalam menghasilkan antioksidan yang tinggi (difraksinasi dengan 3 jenis pelarut heksan, etil asetat dan etanol) yang dilihat dari nilai Total Phenolik Content, Total Flavonoid Content dan aktivitas antioksidannya, serta mengetahui konsentrasi ekstrak tanaman terbaik dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen dan daya toksisitasnya. Sebagai sumber adalah kalus yang diperoleh pada penelitian tahun pertama (dari dua tahun penelitian).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak kalus pada pelarut etil asetat memiliki nilai TPC dan TFC tertinggi yaitu nilai TPC 173,800 mg GAE/g, TFC 83,027 mg CE/g. Aktivitas antioksidan kalus tertinggi juga terdapat pada pelarut etil asetat dengan nilai IC_{50} 41,430 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Aktivitas antibakteri ekstrak kalus terhadap bakteri *S. aureus* dan *S. typhi*, pada ketiga jenis pelarut (n-heksan, etil asetat dan etanol) bersifat kuat pada konsentrasi 15-30%. Pada pengujian daya toksisitas dengan menggunakan metode BSLT, ekstrak kalus tanaman sarang semut pada pelarut n-heksan dan etil asetat bersifat lemah (tidak toksik), sedangkan pada pelarut etanol bersifat kuat (toksik). Hasil ini menunjukkan bahwa ekstrak kalus tanaman sarang semut berpotensi sebagai antioksidan (antikanker) dan juga sebagai anti mikroba (menghambat pertumbuhan bakteri patogen sebagai sumber penyakit), sama seperti tanaman yang diperoleh di alam sehingga diharapkan akan memberikan kontribusi ilmiah tidak saja di bidang Biologi dalam usaha perlindungan tanaman (konservasi), tapi juga di bidang Farmasi (obat-obatan) yaitu berupa informasi potensi tanaman lokal sebagai bahan baku obat dan alternatif penggunaan bahan baku obat selain diperoleh langsung dari alam.

Kata kunci: ekstrak tanaman sarang semut, kalus, antioksidan, toksisitas, antimikroba

PRAKATA

Assalamu'alaikum Wr.Wb

Alhamdulillahrabbi'l'amin. Puji dan syukur kami panjatkan kepada Allah SWT, karena Rahmat dan Karunia-Nya kami dapat menyelesaikan laporan tahun terakhir penelitian hibah PDUPT yang berjudul "Potensi Ekstrak Kalus Tanaman Sarang Semut (*Myrmecodia Tuberosa* Jack) Hasil *In Vitro* sebagai Antioksidan Dan Antimikroba" dengan baik.

Selama melaksanakan penelitian ini, banyak sekali bantuan dan dukungan yang diperoleh. Untuk itu pada kesempatan ini, kami mengucapkan terima kasih kepada:

1. Kementrian Riset, Teknologi dan Perguruan Tinggi yang telah memberikan bantuan dana penelitian.
2. Prof. Dr. H. Masjaya, M.Si sebagai Rektor Universitas Mulawarman.
3. Prof. Dr. Susilo, M.Pd sebagai Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat Universitas Mulawarman.
4. Dr. Eng. Idris Mandang, M.Si sebagai Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
5. Dr. Chaerul Saleh, M.Si dan Eko Kusumawati, M.P sebagai anggota penelitian.
6. Berbagai pihak yang telah membantu selama penelitian ini.

Semoga hasil penelitian ini dapat memberikan kontribusi bagi ilmu pengetahuan dan bermanfaat bagi mereka yang memerlukannya, dan semoga penelitian ini tidak berhenti sampai disini tetapi dapat berlanjut dengan skema penelitian lain, sehingga hasilnya nanti bisa dinikmati oleh masyarakat.

Samarinda, November 2018

Tim Pelaksana Peneliti

DAFTAR ISI

HALAMAN PENGESAHAN	2
RINGKASAN.....	3
PRAKATA	5
DAFTAR ISI	5
DAFTAR TABEL	
DAFTAR GAMBAR	
DAFTAR LAMPIRAN	
BAB I PENDAHULUAN	9
1.1 Latar Belakang.....	9
1.2 Rumusan Masalah.....	10
1.3 Tujuan Khusus	10
1.4 Urgensi Penelitian.....	11
BAB II RENSTRA DAN PETA JALAN PENELITIAN PERGURUAN TINGGI	13
BAB III TINJAUAN PUSTAKA.....	14
3.1 Tanaman Sarang Semut (<i>Myrmecodia tuberosa</i> Jack.).....	14
3.2 Kultur Jaringan (<i>In Vitro</i>).....	15
3.3 Metabolit Sekunder.....	16
3.4 Antibakteri	16
3.4.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	16
3.4.2 <i>Salmonella typhi</i>	17
3.5 Uji Toksisitas	17
BAB IV METODE PENELITIAN.....	17
4.1 Alat dan Bahan.....	18
4.2 Prosedur Kerja	18
4.3 Analisa Data Penelitian.....	20
4.4 Indikator Keberhasilan.....	20
4.5 Bagan Alir Rencana Penelitian Selama 2 Tahun	20
BAB V HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI	21
5.1 Hasil Rendemen Ekstrak Kalus Tanaman Sarang Semut (<i>Myrmecodia tuberosa</i> Jack.)	21
5.2 Uji Fitokimia Ekstrak Kalus Tanaman Sarang Semut dari 3 Pelarut yang Berbeda	21
5.3 Penentuan Total Phenolic Content (TPC) dan Total Flavonoid Content (TFC) Ekstrak Kalus Tanaman Sarang Semut dari 3 Pelarut yang Berbeda.....	22
5.4 Hasil Uji Aktifitas Antioksidan Ekstrak Kalus Tanaman Sarang Semut dari 3 Pelarut yang Berbeda	24
5.5 Hasil Uji Toksisitas dengan Metode BSLT (<i>Brine Shrimp Letality</i> <i>Test</i>)	26
5.6 Hasil Uji Antibakteri	27
BAB 6. KESIMPULAN	31
DAFTAR PUSTAKA.....	31

DAFTAR TABEL

Tabel 1.1 Rencana Target Capaian Tahunan.....	12
Tabel 5.1 Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Kalus Tanaman Sarang Semut (<i>Myrmecodia tuberosa</i> Jack.)	21
Tabel 5.2 Hasil Nilai TFC dan TPC dari ekstrak total, ekstrak etanol, ekstrak fraksi n-heksan dan ekstrak fraksi etil asetat Ekstrak Kalus Tanaman Sarang Semut	23
Tabel 5.3 Hasil Uji Aktifitas Antioksidan Ekstrak Kalus Tanaman Sarang Semut dari 3 Pelarut yang Berbeda.....	24
Tabel 5.4 Nilai LC50 (ppm) Ekstrak Kalus Tanaman Sarang Semut hasil In Vitro Terhadap <i>Artemia salina</i> Leach Menggunakan pelarut n-heksan, etil asetat dan Etanol.....	26
Tabel 5.3 Rata-rata Diameter Daya Hambat (mm) Ekstrak Kalus Tanaman Sarang Semut terhadap <i>S.aerus</i> dan <i>S. typhi</i> Menggunakan pelarut n-heksan, etil asetat dan Etanol.....	27

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Riset Unggulan LP2M UNMUL	13
Gambar 2. Keterkaitan Renstra Topik-Road Map	14

DAFTAR LAMPIRAN

LAMPIRAN 1. JUSTIFIKASI ANGGARAN PENELITIAN.....	32
LAMPIRAN 2. KETERSEDIAAN SARANA DAN PRASARAN PENELITIAN	34
LAMPIRAN 3. SUSUNAN ORGANISASI TIM PENELITI DAN PEMBAGIAN TUGAS	35
LAMPIRAN 4. BIODATA KETUA DAN ANGGOTA TIM PENGUSUL	36
LAMPIRAN 5. SURAT PERNYATAAN	50
LAMPIRAN 6. SERTIFIKAT NASIONAL	51
LAMPIRAN 7. SERTIFIKAT INTERNASIONAL	52
LAMPIRAN 8. JURNAL INTERNASIONAL.....	53
LAMPIRAN 9. BUKU AJAR.....	54

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tumbuhan sarang semut (*Myrmecodia tuberosa* Jack) merupakan tumbuhan asli Indonesia yang telah lama digunakan oleh penduduk untuk mengobati berbagai penyakit. Berdasarkan hasil penelitian modern didapati bahwa tumbuhan sarang semut mengandung senyawa aktif penting seperti flavonoid, tanin, tokoferol, fenolik dan kaya berbagai mineral yang sangat berguna sebagai antioksidan dan anti kanker (Hendra, 2008). Dalam uji *in vitro*, terbukti bahwa sarang semut ampuh menghambat pertumbuhan sel kanker seperti kanker serviks, kanker paru dan kanker usus (Manoi, 2008; Subroto dan Saputro, 2008), sel kanker servik dan payudara (HeLa dan MCM-B2 cells) (Soeksmanto dkk., 2010), sel kanker mulut (sel B88) (Supriatno, 2014) dan juga berfungsi sebagai anti oksidan dan anti mikroba (Prachayasittikul dkk., 2008).

Popularitas tumbuhan sarang semut yang melambung karena khasiatnya sebagai tanaman obat mengakibatkan banyak orang yang memburu tumbuhan sarang semut di alam, sehingga kontinuitas keberadaan tumbuhan tersebut di alam menjadi terancam. Oleh sebab itu perlu dilakukan usaha pelestarian melalui mekanisme pemuliaan dan pembudidayaan.

Salah satu metode budidaya yang dapat digunakan adalah teknik kultur jaringan (*in vitro*). Teknik kultur jaringan dapat menghasilkan tanaman dalam jumlah yang banyak dan dalam waktu yang relatif singkat (Bhatia and Dahiya, 2015; George and Sherrington, 1984). Beberapa faktor yang mempengaruhi keberhasilan kultur jaringan adalah media tanam, zat pengatur tumbuh (zpt), sumber eksplan yang digunakan dan faktor lingkungan. Jenis dan variasi konsentrasi zat pengatur tumbuh yang ditambahkan ke dalam media sangat menentukan keberhasilan teknik kultur jaringan (Shi, 2014).

Selain untuk budidaya tanaman, kultur jaringan juga digunakan untuk memproduksi metabolit sekunder tanaman. Kultur jaringan mempunyai manfaat besar di bidang farmasi karena dapat membantu ketersediaan bahan untuk produksi senyawa obat (Radha dkk., 2011). Pada umumnya untuk mempelajari sintesis metabolit sekunder secara kultur jaringan yang sering digunakan adalah kultur organ, kultur suspensi sel dan kultur kalus (George and Sherrington, 1984). Pengembangbiakan massal melalui kultur jaringan tak mempengaruhi kandungan senyawa aktif sebuah tanaman.

Tanaman sarang semut merupakan tanaman epifit yang hidup bersimbiosa dengan semut. Pada bagian dalam umbi terdapat domatia atau labirin yang dihuni oleh ratusan semut. Bagian umbi inilah yang sering digunakan sebagai obat (Huxley, 1978); (Soeksmanto dkk., 2010). Jika tanaman sarang semut akan dibiakkan secara kultur jaringan maka perlu kajian yang mendalam tentang kandungan metabolit sekunder yang dihasilkan. Oleh sebab itu dilakukan penelitian ini untuk mengetahui kandungan metabolit sekunder yang dihasilkan oleh kalus tanaman sarang semut yang dihasilkan secara *in vitro*, pengaruh prekursor yang ditambahkan (sukrosa) dalam meningkatkan kandungan metabolitnya serta mengetahui senyawa metabolit sekunder yang dimiliki oleh kalus sarang semut yang berpotensi sebagai antioksidan dan antimikroba. Aktivitas antimikroba juga erat kaitannya dengan toksisitas tanaman dan toksisitas tanaman erat kaitannya dengan senyawa-senyawa metabolit sekunder yang ada di dalamnya (Lisdawati dkk., 2006). Oleh sebab itu pada penelitian ini nantinya juga akan diuji toksisitas ekstrak kalus sarang semut terhadap larva *Artemia salina* Leach.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian di atas beberapa masalah yang akan dijawab dengan penelitian ini adalah 1) apakah kalus tanaman sarang semut (yang dihasilkan dari penelitian tahun 1) jika diekstraksi dengan pelarut yang berbeda (n-heksan, etil asetat dan etanol) akan mempunyai nilai TPC, TFC dan aktivitas antioksidan yang berbeda dan pada pelarut mana yang menghasilkan antioksidan paling tinggi? 2) apakah ekstrak kalus tanaman sarang semut dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dan bakteri *Salmonella typhi* dan mempunyai memiliki efek toksik terhadap *Artemia salina* Leach.?

1.3 Tujuan Khusus

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui dan mengungkapkan potensi yang dimiliki oleh ekstrak kalus tanaman sarang semut sebagai tanaman obat yang mempunyai kandungan antioksidan yang tinggi sehingga berpeluang sebagai antikanker serta kemampuannya dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen. Dalam jangka pendek, penelitian ini akan menghasilkan kalus tanaman sarang semut secara *in vitro* yang akan diekstraksi dari pelarut yang berbeda (n-heksan, etil asetat dan etanol) sehingga diketahui nilai TPC, TFC dan aktivitas antioksidannya. Ekstrak kalus dari pelarut yang mempunyai nilai antioksidan yang tinggi digunakan untuk menghambat pertumbuhan

bakteri *Staphylococcus aureus* dan bakteri *Salmonella typhi*, dan untuk uji toksisitas menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)

Jangka panjang, ekstrak kalus tanaman sarang semut terbaik yang mempunyai nilai aktivitas antioksidan yang tinggi dapat digunakan untuk menghambat pertumbuhan sel kanker. Seperti diketahui bahwa kanker merupakan salah satu penyebab kematian tertinggi di dunia. Penggunaan kalus tanaman sarang semut dapat dijadikan alternatif pengganti bahan baku obat yang selama ini selalu di dapat dari alam. Selain untuk menjaga keberlangsungan hidup tanaman potensial di alam agar tidak punah, dengan menggunakan kalus dan penambahan prekursor tertentu ke dalam media dapat meningkatkan kandungan metabolit sekunder dibandingkan tanaman asli di alam.

1.4 Urgensi Penelitian

Pemanfaatan tanaman obat dalam mengobati berbagai penyakit dewasa ini semakin meningkat. Banyak sekali hasil penelitian yang menunjukkan bahwa bagian tertentu tanaman, potensial untuk digunakan sebagai bahan baku obat. Penggunaan ekstrak umbi tanaman sarang semut dalam menghambat pertumbuhan beberapa jenis kanker sudah dilakukan (Soeksmanto dkk.,2010); (Supriatno, 2014). Akan tetapi pemanfaatan bagian tanaman tanpa adanya upaya budidaya bisa berdampak negatif terhadap keberadaan tanaman tersebut jika dilakukan dalam jangka waktu yang lama. Oleh sebab itu alternatif penggunaan bahan baku selain mengambil dari alam bisa dikembangkan. Penggunaan kalus tanaman yang diperoleh menggunakan teknik kultur jaringan merupakan salah satu solusi yang dapat digunakan. Selain sebagai pengganti bahan baku tanaman yang diperoleh langsung dari alam, dengan menggunakan bahan baku kalus, kandungan metabolit sekunder tanaman dapat ditingkatkan bahkan bisa melebihi kandungan yang dimiliki tanaman aslinya.

Sejauh ini belum ada informasi maupun penelitian mengenai aktivitas antioksidan dan antimikroba ekstrak kalus tanaman sarang semut hasil *in vitro* sehingga penelitian ini perlu dilakukan. untuk mengetahui ekstrak kalus dengan pelarut terbaik dalam menghasilkan aktivitas antioksidan yang dipercaya dapat menangkal radikal bebas dan menghambat pertumbuhan mikroba. Diharapkan penelitian ini bermanfaat sebagai informasi ilmiah dibidang farmasi dan industri obat-obatan bahwa bahan baku obat tidak harus diperoleh dari tanaman langsung di alam tetapi bisa menggunakan teknik *in vitro*. Informasi ini juga diharapkan bermanfaat di bidang konservasi tanaman khususnya jenis

tanaman potensial dan endemik di suatu daerah agar bisa dimanfaatkan tanpa merusak populasi bahkan sampai menyebabkan erosi genetik untuk tanaman potensial seperti tanaman sarang semut.

Tabel 1.1 Rencana Target Capaian Tahunan

No	Jenis Luaran				Indikator Capaian	
	Kategori	Sub Kategori	Wajib	Tambahan	TS1	TS+1
1	Artikel Ilmiah dimuat di jurnal	Internasional bereputasi	✓		Draft/ submitted	accepted/ published
		Nasional terakreditasi		✓	Tidak ada	Tidak ada
2	Artikel Ilmiah dimuat di prosiding	Internasional Terindeks		✓	Tidak ada	Tidak ada
		Nasional		✓	Tidak ada	Tidak ada
3	Invited speaker dalam temu ilmiah	Internasional		✓	Tidak ada	Tidak ada
		Nasional		✓	Tidak ada	Tidak ada
4	Visiting Lecturer	Internasional		✓	Tidak ada	Tidak ada
5	Hak Kekayaan Intelektual (HKI)	Paten		✓	Tidak ada	Tidak ada
		Paten sederhana		✓	Tidak ada	Tidak ada
		Hak Cipta		✓	Tidak ada	Tidak ada
		Merek dagang		✓	Tidak ada	Tidak ada
		Rahasia dagang		✓	Tidak ada	Tidak ada
		Desain produk industri		✓	Tidak ada	Tidak ada
		Indikasi geografis		✓	Tidak ada	Tidak ada
		Perlindungan varietas tanaman		✓	Tidak ada	Tidak ada
		Perlindungan topografi sirkuit terpadu		✓	Tidak ada	Tidak ada
6	Teknologi Tepat Guna			✓	Draft	Produk
7	Model/Purwarupa/Desain/Karya seni/Rekayasa Sosial			✓	Tidak ada	Tidak ada
8	Buku Ajar			✓	Draft	Published
9	Tingkat Kesiapan Teknologi			✓	2	3

BAB II. RENSTRA DAN PETA JALAN PENELITIAN PERGURUAN TINGGI

Rencana Strategis pengembangan penelitian dan pengabdian masyarakat LP2M Unmul adalah *integrated sustainable tropical ecosystem- based development*, yang sebagaimana diterjemahkan menjadi 5 (lima) bidang unggulan (comfortarea) yang menjadi wilayah kreatif inovatif para peneliti yaitu : 1) Pangan (biodiversitas pangan local dan manfaatnya), 2) Lingkungan dan SDA (perlindungan dan pengelolaan lingkungan dan SDA tropis), 3) Budaya dan Informasi (kesetaraan dan harmonisasi hidup di lingkungan tropis), 4)Energy (perlindungan dan pengelolaan SDA dan iklim tropis sebagai sumber energy dan energy terbarukan), dan 5) kesehatan (penyakit tropis dan pemanfaatan biodiversitas).



Gambar 1. Riset Unggulan LP2M UNMUL

Penelitian ini mendukung bidang unggulan yang kelima yaitu kesehatan (penyakit tropis dan pemanfaatan biodiversitas), dimana tanaman sarang semut yang menjadi objek penelitian ini adalah tanaman obat asli Kalimantan, sehingga pemanfaatannya berarti merupakan pemanfaatan biodiversitas tanaman lokal. Hal ini juga berkaitan dengan salah satu topik unggulannya yaitu pemanfaatan tanaman berbasis biodiversity kaltim untuk obat dan kosmetik. Diharapkan nantinya hasil penelitian ini dapat menjadi dasar dari peta jalan penelitian LP2M UNMUL, yaitu tahun 2019 menghasilkan produk-produk penelitian yang siap pakai khususnya alternatif pengganti bahan baku untuk tanaman obat dan dapat digunakan oleh masyarakat pada tahun 2020, tanpa mengurangi aspek konservasi dan pelestarian plasma nutfah tanaman.



Gambar 2. Keterkaitan Renstra Topik-Road Map

BAB III TINJAUAN PUSTAKA

3.1 Tanaman Sarang Semut (*Myrmecodia tuberosa* Jack.)

Sarang semut merupakan tanaman dari suku Hydnophytinae (Rubiaceae) yang berasosiasi dengan semut. Tanaman ini bersifat epifit, artinya menempel pada tanaman lain, tidak hidup secara parasit pada inangnya tetapi hanya memanfaatkannya untuk menempel. Tanaman sarang semut terdiri dari 5 genus yaitu *Hydnophytum*, *Myrmecodia*, *Anthorrhiza* (di daratan Papua Nugini), *Myrmephytum* (di daratan Papua Nugini dan Filipina) dan *Squamellaria* (merupakan tanaman lokal di Pulau Fiji), namun yang paling dekat berasosiasi dengan semut hanya genus *Hydnophytum* dan *Myrmecodia*. Genus *Hydnophytum* terdiri dari 45 spesies sedangkan *Myrmecodia* memiliki 26 spesies. Semua spesies dari kedua genus ini memiliki batang yang menggelembung dan berongga-rongga. Namun dari sekian banyak spesies dari kedua genus tersebut, hanya jenis *H. formicarum*, *M. tuberosa*, *M. pendens* yang digunakan sebagai obat (Subroto dan Saputro, 2008; Soeksmanto dkk., 2010).

Dalam uji *in vitro*, terbukti bahwa sarang semut ampuh menghambat pertumbuhan sel kanker. Peneliti Gui Kim Tran, Yasuhiro Tezuka, Yuko Harimaya, dan Arjun menyatakan bahwa ekstrak sarang semut bersifat antiproliferasi terhadap 3 jenis kanker yaitu kanker serviks, kanker paru dan kanker usus (Manoi, 2008; Subroto dan Saputro, 2008). Ekstrak tanaman sarang semut (*M. pendens*) dapat menghalangi pertumbuhan sel kanker servik dan payudara (HeLa dan MCM-B2 cells) (Soeksmanto dkk., 2010). Ahmad dkk. (2010) menyatakan bahwa jenis *Hydnophytum formicarum* mempunyai total fenolik dan *antioxidant activity* (AOA) yang tinggi. Prachayasittikul dkk. (2008) juga menjelaskan bahwa *H. formicarum* dapat berfungsi sebagai antioksidan dan antimikroba.

3.2 Kultur Jaringan (*In Vitro*)

Teknik kultur jaringan tanaman sangat potensial untuk program pemuliaan tanaman. Dibandingkan dengan perbanyakan tanaman secara konvensional, perbanyakan tanaman secara kultur jaringan mempunyai kelebihan yaitu dapat memperbanyak tanaman tertentu yang sulit atau sangat lambat diperbanyak secara konvensional, ditumbuhkan dalam waktu relatif singkat sehingga lebih ekonomis (Yusnita, 2003). Kultur jaringan tanaman yang sering digunakan dalam produksi metabolit sekunder adalah kultur kalus dan kultur suspensi sel. Kultur kalus dan kultur sel tanaman secara *in vitro* adalah sumber yang potensial untuk produksi metabolit sekunder.

Kultur kalus adalah membiakkan sekelompok sel yang berasal dari jaringan tanaman yang tumbuh dalam medium hara. Medium tersebut terbuat dari garam anorganik, sumber karbon (biasanya sukrosa), auksin dan sitokinin. Komposisi medium merupakan hal yang penting bagi masing-masing spesies yang dibiakkan. Untuk menghasilkan kalus yang baik, zat hara berperan merangsang pertumbuhan sel dengan cepat. Beberapa jaringan tanaman dapat digunakan untuk membentuk biakan kalus seperti akar, batang, daun, meristem dan anther. Namun demikian, untuk spesies-spesies tertentu dari salah satu jenis kalusnya dapat menghasilkan kalus yang lebih baik dari yang lainnya (Suryowinoto, 1996).

3.3 Metabolit Sekunder

Analisis kimia dari tanaman sarang semut menunjukkan bahwa tanaman ini mengandung senyawa-senyawa kimia dari golongan flavonoid dan tanin. Flavonoid merupakan golongan senyawa bahan alam dari senyawa fenolik yang banyak merupakan pigmen tanaman. Fungsi kebanyakan flavonoid dalam tubuh manusia adalah sebagai antioksidan, sehingga sangat baik untuk pencegahan kanker. Penelitian-penelitian mutakhir telah mengungkapkan fungsi lain dari flavonoid, tidak saja untuk pencegahan, tetapi juga untuk pengobatan kanker. Mekanisme kerja flavonoid lainnya adalah inaktivasi karsinogen, antiproliferasi, penghambatan siklus sel, induksi apoptosis, diferensiasi, inhibisi angiogenesis serta pembalikan resistensi multi obat ataupun kombinasi dari mekanisme-mekanisme tersebut. Tanaman sarang semut juga mengandung tokoferol. Tokoferol berfungsi sebagai anti oksidan dan anti kanker. Ia menangkalkan serangan radikal bebas dengan cara anti degeneratif. Senyawa kaya vitamin E ini mempunyai manfaat sebagai anti penuaan. Bila manusia mengkonsumsi banyak lemak

dan radikal bebas, dengan adanya tokoferol akan bisa diatasi karena peran vitamin E bagi kesehatan amat vital. Vitamin E mencegah asam lemak tak jenuh, komponen sel membran dari oksidasi oleh radikal bebas (Manoi, 2008).

3.4 Antibakteri

Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan untuk mengukur besar potensi atau konsentrasi suatu senyawa dapat memberikan efek bagi mikroorganismenya. Senyawa antibakteri dapat bersifat menghambat pertumbuhan bakteri (bakteriostatik) dan ada yang bersifat membunuh bakteri (bakterisidal).

3.4.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus adalah bakteri gram positif yang berbentuk *coccus* dan berdiameter antara 0,8-1,0 mikron. Bakteri ini tidak bergerak dan tidak berspora. *S. aureus* termasuk jenis bakteri yang kuat daya tahannya dan dapat tumbuh pada suhu 15 °C sampai 40 °C, sedangkan suhu pertumbuhan maksimumnya adalah 35 °C. Bakteri ini dapat tumbuh dalam udara yang hanya mengandung hidrogen (Waluyo, 2008). *S. aureus* merupakan suatu bakteri penyebab keracunan yang memproduksi enterotoksin dan dapat menyebabkan penyakit seperti diare, infeksi saluran kemih, meningitis pada bayi yang baru lahir, dan infeksi luka (Jawetz dkk., 1986).

3.4.2 *Salmonella typhi*

Salmonella typhi merupakan bakteri Gram negatif, tidak berspora dan mempunyai flagel peritrik, kecuali *Salmonella pullorum* dan *Salmonella gallinarum*. Ukuran 1-3,5 µm x 0,5-0,8 µm. Besar koloni dalam media perbenihan rata-rata 2-4 mm. *Salmonella* tumbuh pada suasana aerob atau anaerob fakultatif, pada suhu 15-41⁰ C. Suhu pertumbuhan optimum 37,5⁰ C dengan pH media 6-8 (Radji, 2010). *Salmonella typhi* menyebabkan penyakit *typhus* yakni demam tifoid yang dapat menyerang semua organ tubuh manusia secara sistemik.

3.5 Uji Toksisitas

Salah satu metode awal yang sering digunakan untuk mengamati toksisitas senyawa dan merupakan metode penapisan untuk aktivitas senyawa kimia dalam ekstrak tanaman adalah *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) menggunakan larva udang *Artemia salina* Leach. Uji kematian larva udang merupakan uji pendahuluan untuk mengamati aktifitas farmakologi suatu senyawa. Uji yang sama juga telah dilakukan oleh Umi

dkk.,(2013) terhadap tanaman *Bauhinia purpurea* L, dan Moshi dkk., (2010) terhadap beberapa tanaman obat yang terdapat di wilayah Kagera.

BAB IV METODE PENELITIAN

Metode penelitian yang diusulkan dalam penelitian ini merupakan metode eksperimen laboratorium dimana pada tahun pertama penelitian kalus sudah dapat dihasilkan dari sumber eksplan yang berbeda pada tanaman sarang semut hasil *in vitro* dengan penambahan zat pengatur tumbuh Kinetin dan 2,4 D. Penelitian dilanjutkan dengan aplikasi konsentrasi sukrosa untuk meningkatkan kandungan metabolit pada kalus. Pada tahun kedua ini kalus dengan kandungan metabolit sekunder terbaik difraksinasi dengan menggunakan 3 pelarut yang berbeda (n-heksan, etil asetat, etanol). Ekstrak kalus dengan pelarut terbaik dalam menghasilkan nilai TPC, TFC dan uji aktivitas antioksidan digunakan untuk menghambat pertumbuhan sel bakteri *Staphylococcus aureus* dan bakteri *Salmonella typhi*. Penelitian untuk mendapatkan kalus tanaman sarang semut secara *in vitro* dilakukan di laboratorium kultur jaringan, ekstraksi kalus dilakukan di laboratorium Biokimia, FMIPA UNMUL. Sedangkan untuk aplikasi ekstrak kalus tanaman sarang semut untuk menghambat pertumbuhan sel bakteri *S. aureus* dan bakteri *Salmonella typhi*, dan uji toksisitas tanaman dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Genetika Molekuler, FMIPA UNMUL.

Program tahun kedua meliputi: 1) Hasil dari program tahun pertama berupa ekstrak kalus terbaik diaplikasikan pada program penelitian tahun kedua. 2) Kalus yang memiliki kandungan metabolit terbanyak (dari hasil program tahun pertama), diperbanyak dengan cara di sub kultur sebagai bahan untuk ekstraksi. 3) Ekstrak kalus difraksinasi dengan menggunakan 3 jenis pelarut yaitu n-heksan, etil asetat dan etanol. 3) Selanjutnya masing-masing ekstrak kalus pada pelarut yang berbeda diuji untuk melihat kandungan nilai Total Phenolik Content (TPC), nilai Total Flavonoid Content (TFC) dan nilai aktivitas antioksidan. 4). Ekstrak kalus yang mempunyai nilai TPC, TFC dan aktifitas antioksidan tertinggi digunakan untuk menghambat pertumbuhan bakteri patogen dan uji toksisitasnya.

4.1 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan adalah *freeze drying* (Christ Alpha 1-2 LD), timbangan, blender, erlenmeyer, gelas ukur, labu ukur, spatula, *beaker glass*, *rotary evaporator* (Buchi The RII), neraca analitik, tabung reaksi, mikropipet, lemari es, spektrofotometer

UV-Vis (Shimadzu UVmini-1240), cuvet, *hot plate*, cawan petri, *autoclave*, *laminar air flow*, spatula, *vortex*, *incubator*, lemari es, lampu bunsen, jarum ose, pinset, jangka sorong, kertas saring, lampu TL 18 watt.

Bahan-bahan yang digunakan adalah kalus tanaman sarang semut, larva *Artemia salina* Leach, air laut, *n*-heksan, etil asetat, alkohol 95%, etanol, aquades, DMSO (*dimetil sulfoksida*), *aluminium foil*, H₂SO₄ 2 M, HCl pekat, pereaksi *Lieberman-Burchard* (CH₃COOH glasial : H₂SO₄pekat), FeCl₃ 1%, pereaksi *dragendroff* (campuran Bi(NO₃)₂.5H₂O dalam asam nitrat dan larutan KI), serbuk Mg, DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhidrazyl*), vitamin C, kloroform-amoniak, dietil eter, *Folin-Ciocalteau*, Na₂CO₃ 20%, asam galat, AlCl₃ 10%, *catechin*, NaNO₂ 5%, NaOH 1 M, larutan NaCl 0,9 %, kertas cakram, kloramfenikol dan media *Mueller-Hinton Agar* (MHA) Oxoid.

4.2 Prosedur kerja

A. Fraksinasi: Fraksinasi bertingkat dilakukan menurut Harborne (1987).

B. Uji Fitokimia

1. Penentuan total fenol

Larutan standar asam galat dibuat beberapa konsentrasi (0-250 mg/l) dalam methanol:air (50:50 v/v). Sebanyak 0,5 ml ekstrak tanaman sarang semut dimasukkan ke dalam tabung uji, ditambahkan 5 ml reagen Folin-Ciocalteau dan 4 ml larutan Na₂CO₃ 2%. Selanjutnya diinkubasi pada suhu ruang selama 15 menit. Absorbansinya diukur pada panjang gelombang ± 750 nm dengan menggunakan spektrofotometer (Orak, 2007)

2. Penentuan total flavonoid

Penentuan total flavonoid menggunakan Aluminium chloride colorimetric technique (ACCT). Catechin sebagai larutan standar dibuat beberapa konsentrasi (12,5-100 μ g/ml) dalam etanol. Sebanyak 0,5 ml ekstrak metanol (ekstrak tanaman sarang semut) dimasukkan ke dalam tabung uji dan ditambahkan 1,5 ml etanol, AlCl₃ 10% sebanyak 0,1 ml, CH₃COOH 1 M sebanyak 0,1 ml dan 2,8 ml akuades. Kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit. Absorbansi diukur pada panjang gelombang ± 500 nm dengan menggunakan spektrofotometer, lalu dibuat kurva kalibrasi hubungan antara konsentrasi sampel (mg/l) dengan absorbansi dengan hasil yang didapat (Imran dkk., 2011).

3. Uji Aktivitas Antioksidan

Ekstrak etanol, ekstrak fraksi *n*-heksan dan ekstrak fraksi etil asetat dilakukan uji antioksidan dengan metode perendaman radikal DPPH mengacu pada metode Bouftira et al. (2012). Uji perendaman pereaksi DPPH dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis suhu kamar (37⁰C) dan larutan DPPH digunakan sebagai radikal bebas serta vitamin C sebagai pembanding.

4. Uji Antimikroba

Diusapkan suspensi *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella typhi* ke permukaan media MHA hingga merata. Setelah itu kertas cakram dicelupkan ke dalam ekstrak kalus sarang semut (konsentrasi kontrol (aquades), kloramfenikol 0,1%, 15%, 30%, 45% dan 60%) pada masing-masing pelarut kemudian diletakkan dipermukaan media dan diinkubasi pada suhu 37⁰ C selama 24 jam. Diamati dan diukur zona hambat yang terbentuk.

5. Uji Toksisitas

Uji toksisitas dengan menggunakan metoda BSLT (Urmi dkk., 2013) menggunakan 10-15 ekor larva udang pada setiap botol uji yang kemudian ditambahkan ekstrak kasar tanaman dari masing-masing pelarut. Percobaan dilakukan menggunakan 9 konsentrasi (1000 ppm, 500 ppm, 250 ppm, 125 ppm, 62.5 ppm, 31.2 ppm, 15.6 ppm, 7.8 ppm dan kontrol). Jumlah larva yang mati dihitung dalam waktu 24 jam dan dianalisa untuk menentukan nilai LC₅₀.

4.3 Analisa Data Penelitian

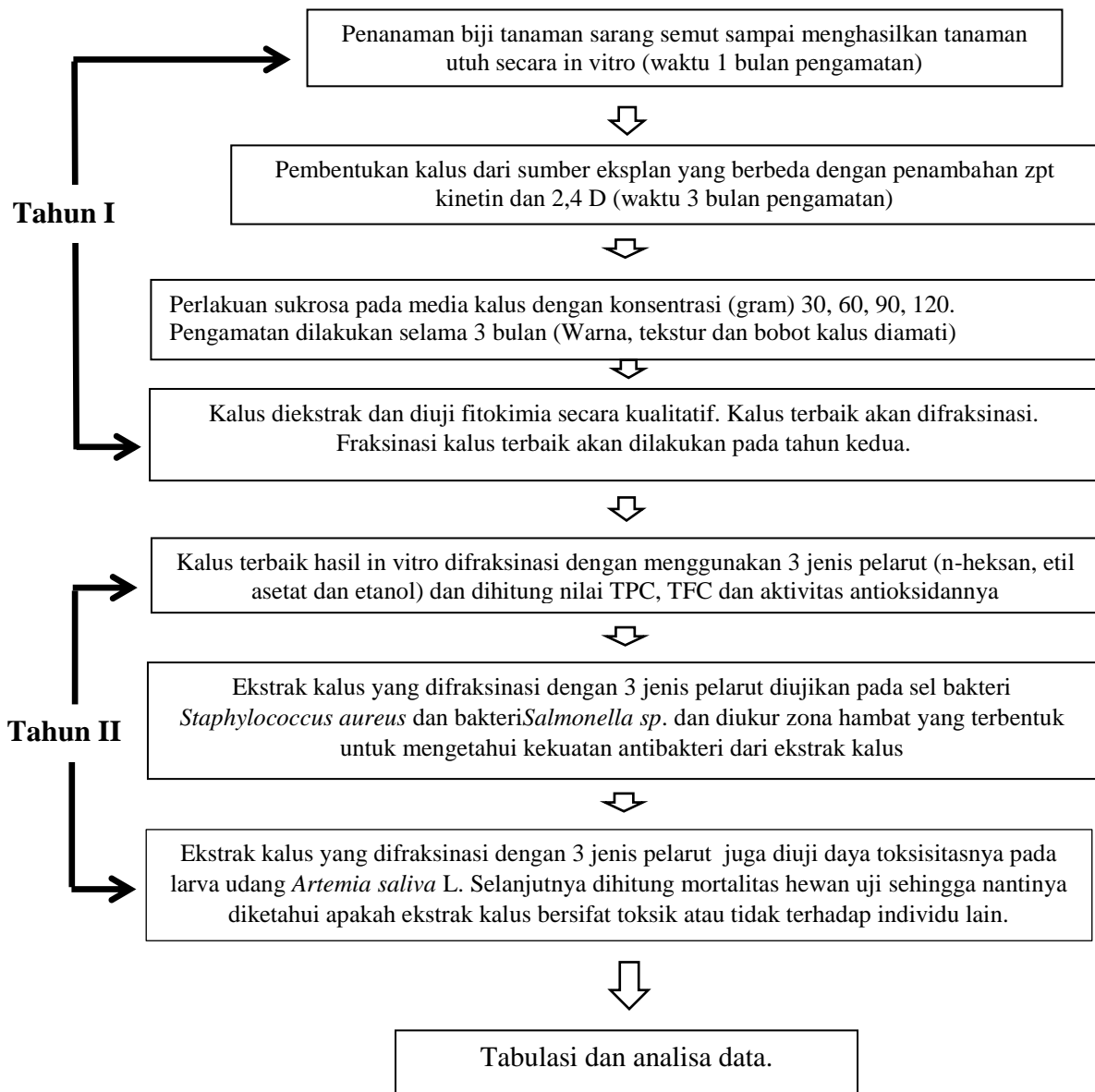
Data kualitatif yang diperoleh disajikan secara deskriptif, sedangkan data kuantitatif disajikan dalam mean ± SE (Standard Error). Data uji fitokimia nilai TPC, TFC dan aktivitas antioksidan disajikan dalam bentuk grafik. Mean data hasil pengamatan pada uji antibakteri dianalisis menggunakan uji analisis varian (Anava), untuk mengetahui adanya beda nyata. Jika ada beda nyata, maka uji dilanjut dengan menggunakan uji DMRT pada taraf $\alpha = 5\%$. Untuk uji toksisitas dihitung mortalitas dan nilai LC₅₀ sehingga diketahui tingkat toksisitas yang dihasilkan ekstrak kalus tanaman sarang semut.

4.4 Indikator Keberhasilan

Indikator keberhasilan adalah: 1) Diperoleh ekstrak kalus dengan pelarut terbaik dalam menghasilkan nilai TPC, TFC, aktivitas antioksidan. 2) Diketuinya potensi yang

dimiliki oleh ekstrak kalus dalam menghambat bakteri patogen. 3) Diketuinya daya toksisitas dari ekstrak kalus, sehingga nantinya diharapkan ekstrak kalus tanaman sarang semut berpotensi sebagai antikanker sama atau bahkan lebih dari ekstrak tanaman yang berasal dari alam.

4.5 Bagan Alir Rencana Penelitian Selama 2 Tahun



BAB V. HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI

A. HASIL

5.1. Hasil Rendemen Ekstrak Kalus Tanaman Sarang Semut (*M. tuberosa* L.)

Hasil ekstraksi kalus tanaman sarang semut terhadap 3 jenis pelarut menunjukkan persentase rendemen yang berbeda-beda. Hasil maserasi dengan menggunakan pelarut etanol diperoleh ekstrak kental seberat 1,207 gr (rendemen 1,04 %) dari 115,761 gr simplisia yang digunakan. Dari ekstrak kalus hasil maserasi diperoleh rendemen heksan sebesar 7%, etil asetat 23% dan etanol 2%. Dari persentase ini dapat diketahui peluang suatu sampel untuk dimanfaatkan kandungan metabolit sekundernya. Menurut Salimi dan Bialangi (2014), semakin tinggi nilai persentase rendemen suatu sampel maka diketahui sampel tersebut memiliki peluang yang besar pula untuk dimanfaatkan. Dari hasil persentase rendemen yang tertinggi inilah kita dapat mengetahui senyawa yang terekstraksi pada ekstrak kalus tersebut lebih banyak mengandung senyawa semipolar.

5.2. Uji Fitokimia ekstrak kalus tanaman Sarang Semut dari 3 Pelarut yang Berbeda.

Uji fitokimia secara kualitatif dilakukan untuk mengetahui keberadaan senyawa kimia seperti alkaloid, fenolik, flavonoid, saponin dan steroid/triterpenoid. Hasil uji fitokimia ekstrak ekstrak kalus tanaman sarang semut dapat dilihat pada tabel 5.1 dibawah ini.

Tabel 5.1 Hasil uji fitokimia (kualitatif) ekstrak kalus tanaman sarang semut dari 3 pelarut yang berbeda.

Uji Fitokimia	Ekstrak Total	Ekstrak n-heksan	Ekstrak Etil Acetat	Ekstrak Etanol
Triterpenoid	-	-	-	-
Steroid	+	+	-	-
Flavonoid	+	-	+	-
Fenolik	+	-	+	-
Kuinon	-	-	-	-
Alkaloid	+	-	+	-
Saponin	+	-	-	+

Keterangan: (+) Mengandung senyawa metabolit sekunder

(-) Tidak mengandung senyawa metabolit sekunder

Pada table 5.1. diketahui bahwa pada ekstrak total kalus ditemukan senyawa steroid, flavonoid, fenolik, alkaloid dan saponin. Pemisahan golongan senyawa dilakukan dengan cara ekstraksi pelarut berdasarkan kepolaran memberikan hasil fraksi n-heksan hanya mengandung steroid, fraksi etil asetat mengandung flavonoid, fenolik dan alkaloid sedangkan fraksi etanol sisa mengandung saponin. Fraksi heksana mengandung steroid yang merupakan metabolit non polar sedangkan fraksi etanol sisa mengandung saponin yaitu senyawa glikosida dengan aglikon triterpenoid atau steroid yang berikatan dengan gula sehingga bersifat polar. Fraksi etil asetat mengandung senyawa metabolit dengan kepolaran sedang seperti flavonoid, fenolik dan alkaloid.

Harborne dan Williams (2000) menyatakan bahwa komponen fenolik merupakan kelompok molekul yang besar dan beragam, yang terdiri dari golongan aromatik pada metabolit sekunder tumbuh-tumbuhan. Menurut Siswanto (2012), alkaloid pada tumbuhan memiliki fungsi sebagai zat beracun untuk mencegah serangga atau hewan pemakan tanaman lainnya, pengatur tumbuh, sebagai substansi cadangan untuk memenuhi kebutuhan nitrogen dan juga merupakan hasil akhir detoksifikasi suatu zat yang berbahaya bagi tumbuhan. Sedangkan pada bidang kesehatan alkaloid digunakan untuk memacu sistem saraf, menaikkan tekanan darah, mengurangi rasa sakit dan dapat mencegah infeksi mikrobial.

Senyawa flavonoid bagi tumbuhan berfungsi untuk menarik serangga yang membantu penyerbukan, untuk menarik perhatian binatang yang membantu penyebaran biji (Sirait, 2007) serta aktivitas antioksidan juga dimiliki oleh komponen aktif flavonoid tertentu yang digunakan untuk menghambat pendarahan dan antiskorbut (Robinson, 1995). Menurut Parinding (2007), flavonoid pada tumbuhan dapat meningkatkan dormansi, meningkatkan pembentukan sel-sel kalus, sebagai enzim penghambat pembentukan protein, menghasilkan zat warna pada bunga untuk merangsang serangga, burung dan satwa lainnya untuk mendatangi tanaman tersebut sebagai agen dalam penyerbukan dan penyebaran biji.

5.3. Penentuan Total Phenolik Content (TPC) dan Total Flavonoid Content (TFC) Ekstrak Kalus Tanaman Sarang Semut dari 3 Pelarut yang berbeda.

Nilai TPC dan TFC dari ekstrak kalus pada 3 pelarut yang berbeda dapat dilihat pada tabel di bawah ini :

Tabel 5.2 Hasil Nilai TFC dan TPC dari ekstrak total, ekstrak etanol, ekstrak fraksi *n*-heksan dan ekstrak fraksi etil asetat ekstrak kalus tanaman sarang semut (*M. tuberosa*)

Uji Kuantitatif	Jenis Ekstrak			
	Ekstrak total	Fraksi <i>n</i> -heksan	Fraksi etil asetat	Fraksi etanol
TPC (mg GAE/g)	96,733 ± 0,010	-	173 ± 0,019	-
TFC (mg CE/g)	31,960 ± 0,014	-	83,027 ± 0,021	-

Penentuan total fenolik menunjukkan bahwa ekstrak kalus pada pelarut etil asetat memiliki kadar fenolik sebesar 173,800 mg GAE/g, lebih besar dari ekstrak total. Hal ini terjadi karena pada ekstrak total masih terdapat bermacam metabolit sekunder yang memberikan pengaruh terhadap penentuan total fenolik sedangkan pada ekstrak etil tersebut sudah mengalami pemisahan golongan (fraksinasi) sehingga pengaruh tersebut berkurang. Hal ini berarti bahwa kandungan fenolik ekstrak kalus tanaman sarang semut larut pada etil asetat, senyawa semipolar. Kurva standar adalah $y = 0.0046x + 0.0108$, $R^2 = 0.9977$. Nilai TPC yang dimiliki oleh ekstrak kalus lebih tinggi dibandingkan dengan nilai TPC tanaman sarang semut yang berasal dari alam dari inang mangga, tapi masih lebih rendah dari tanaman sarang semut yang berasal dari inang durian. Sari dkk (2017) yang menguji nilai TPC tanaman sarang semut jenis *Myrmecodia tuberosa* dari 2 inang yang berbeda yaitu pohon mangga dan durian (dengan sumber yang berbeda yaitu umbi, batang dan daun. Dari ketiga sumber tadi diperoleh nilai TPC tertinggi terdapat pada daun tanaman sarang semut inang durian yaitu $319,33 \pm 0,06$ mg GAE/g. Kandungan total fenolik daun tumbuhan sarang semut inang mangga adalah nomor dua terbesar diantara sumber eksplan yang lain yaitu $172,80 \pm 0,02$ mg GAE/g. Hal ini juga membuktikan bahwa kandungan metabolit sekunder yang dihasilkan melalui metoda kultur jaringan tidak berbeda dengan kandungan di alam, bahkan justru bisa lebih besar.

Senyawa fenolik merupakan kelas utama antioksidan yang berada dalam tumbuh-tumbuhan. Kandungan senyawa fenolik ini diketahui sebagai terminator radikal bebas yang umumnya merupakan senyawa fenolik yang berkorelasi positif terhadap aktivitas antiradikal (Marinova dan Batchvarov, 2011).

Penentuan kadar total flavonoid dengan catechin sebagai standar menunjukkan bahwa kadar total flavonod dalam ekstrak fraksi etil asetat lebih tinggi sebesar 83,027 mg CE/g daripada kadar total flavonoid dalam ekstrak etanol total. Hal ini disebabkan dengan

adanya pemisahan senyawa berdasarkan kepolaran maka ekstrak etil asetat menunjukkan kadar total flavonoid yang lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak etanol total. Dari kurva kalibrasi catechin didapatkan hasil persamaan regresi $y = 0.0002x + 0.0062$, $R^2 = 0.9788$. Nilai TFC ekstrak kalus hampir sama dengan nilai TFC pada umbi sarang semut dari alam, tapi lebih kecil dari bahan daun tanaman sarang semut. Menurut Sari dkk (2017) total flavonoid pada umbi tumbuhan sarang semut *M. tuberosa* inang durian adalah $44,10 \pm 0,02$ mg/g CE, pada inang mangga adalah $92,48 \pm 0,02$ mg/g CE. Total flavonoid terbesar terdapat pada daun tumbuhan sarang semut yang berasal dari inang durian yaitu $272,33 \pm 0,02$ mg CE/g, sedangkan pada inang mangga terbesar juga terdapat pada eksplan daun yaitu $162,83 \pm 0,01$ mg CE/g. Menurut Engida dkk (2013) total flavonoid pada umbi *M. pendens* adalah $63,28 \pm 1,75$ mg QE/g. Nilai TFC ekstrak kalus lebih kecil dibanding nilai TPC.

Dari nilai TPC dan TFC yang telah diperoleh pada ekstrak kalus (ekstrak etanol, ekstrak fraksi *n*-heksan dan ekstrak fraksi etil asetat) diketahui bahwa masing-masing dari ekstrak tersebut mengandung senyawa metabolit sekunder yang berpotensi sebagai antioksidan dengan kadar fenolik yang lebih tinggi dibandingkan dengan kadar flavonoid. Hal ini diduga karena distribusi fenolik dan juga flavonoid dalam tumbuhan tidak hanya dipengaruhi oleh faktor genetik tumbuhan, tetapi juga dipengaruhi oleh faktor lingkungan seperti cahaya, kelembaban.

5.4. Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kalus Tanaman Sarang Semut dari 3 Pelarut yang Berbeda

Berdasarkan hasil uji aktivitas antioksidan yang telah dilakukan, diperoleh data perhitungan hasil uji aktivitas antioksidan dengan metode peredaman radikal DPPH untuk ekstrak etanol, ekstrak fraksi *n*-heksan, ekstrak fraksi etil asetat kalus tanaman sarang semut dan vitamin C yang dapat dilihat pada tabel berikut ini.

Tabel 5.3 Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Kalus Tanaman Sarang semut

Sampel	Konsentrasi ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Rata-rata Abs Sampel	% Hambatan	IC ₅₀ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Ekstra Kasar	Blanko	-	-	90,256
	6,25	0,1787	17,87	
	12,5	0,3734	37,34	

	25	0,4734	47,34	
	50	0,5864	58,64	
	100	0,8112	81,12	
Ekstrak Fraksi Etil Asetat	Blanko	-	-	41,430
	6,25	0,2663	26,63	
	12,5	0,3231	32,31	
	25	0,3633	36,33	
	50	0,4432	44,32	
Vitamin C	Blanko	-	-	7,571
	6,25	0,4834	48,34	
	12,5	0,5172	51,72	
	25	0,5544	55,44	
	50	0,6041	60,41	

Tabel di atas menunjukkan bahwa semakin besar konsentrasi sampel uji maka semakin besar pula persen (%) hambatan yang dihasilkan. Hal ini disebabkan karena semakin tinggi konsentrasi sampel yang diberikan, maka semakin tinggi kandungan antioksidannya sehingga berdampak juga pada tingkat penghambatan radikal bebas yang dilakukan oleh zat antioksidan tersebut.

Parameter yang digunakan untuk menunjukkan aktivitas antioksidan adalah IC_{50} (*Inhibition concentration*). Dimana nilai IC_{50} didefinisikan sebagai besarnya konsentrasi ekstrak yang dapat menghambat aktivitas radikal DPPH sebesar 50%. Nilai ini diperoleh dari persamaan regresi linier yang menyatakan hubungan antara konsentrasi ekstrak yang diuji dengan persen penangkapan radikal. Nilai IC_{50} yang semakin kecil menunjukkan aktivitas antioksidan pada bahan yang diuji semakin besar (Molyneux, 2004).

Penentuan aktivitas antioksidan dari kalus dengan asam askorbat sebagai standar menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat memiliki nilai IC_{50} sebesar 41,430 $\mu\text{g mL}^{-1}$ lebih besar dari ekstrak etanol total. Adanya pengaruh yang tidak sinergis dari metabolit sekunder dalam ekstrak etanol total menghasilkan aktivitas antioksidan lebih kecil

daripada ekstrak etil asetat. Secara spesifik suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan yang sangat kuat apabila nilai IC_{50} kurang dari 50 ppm, kuat apabila nilai IC_{50} antara 50-100 ppm, sedang apabila nilai IC_{50} berkisar antara 100-150 ppm dan lemah apabila nilai IC_{50} berkisar antara 150-200 ppm (Molyneux, 2004). Mengacu pada batasan inilah maka dapat dinyatakan bahwa ekstrak etil asetat dari kalus menunjukkan aktivitas antioksidan yang kuat. Jadi dapat disimpulkan bahwa kalus tanaman sarang semut *sama-sama berpotensi* seperti tanaman yang diperoleh langsung dari alam yaitu berpotensi untuk dimanfaatkan sebagai sumber antioksidan.

5.5 Hasil Uji Toksisitas dengan Metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*)

Hasil uji toksisitas terhadap fraksi N-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi etanol menggunakan metode BSLT disajikan dalam Tabel 1 sebagai berikut:

Tabel 5.4. Nilai LC_{50} (ppm) ekstrak kalus tanaman Sarang Semut (*Myrmecodia tuberosa* Jack) hasil *In Vitro* terhadap *Artemia salina* Leach. menggunakan pelarut n-heksan, etil asetat dan etanol

Pelarut	Konsentrasi	Rata-rata <i>A. salina</i> yang mati	Rata-rata <i>A. salina</i> yang hidup	Persentase Kematian	LC_{50}
N-heksana	1000	3	7	32%	5264 ppm
	500	3	7	27%	
	250	2	8	24%	
	125	3	8	24%	
	62.5	2	7	22%	
	31.2	2	7	22%	
	15.6	1	9	12%	
	7.8	0	10	0%	
Etil asetat	1000	2	7	28%	13863 ppm
	500	2	7	19%	
	250	2	9	16%	
	125	1	7	16%	
	62.5	1	10	12%	
	31.2	1	11	8%	
	15.6	0	11	3%	
	7.8	0	10	3%	
Etanol	1000	8	3	70%	245 ppm
	500	5	5	57%	
	250	5	5	55%	
	125	3	6	39%	
	62.5	3	6	33%	
	31.2	3	6	32%	
	15.6	2	6	24%	

	7.8	1	9	11%	
--	-----	---	---	-----	--

Untuk mengetahui bioaktivitas ekstrak kalus tanaman sarang semut (*Myrmecodia tuberosa* Jack) hasil *in vitro* menggunakan pelarut n-heksana, etil asetat dan etanol maka dilakukan uji mortalitas terhadap *Artemia salina* Leach. dengan menggunakan BSLT (*brine shrimp lethality test*). Menurut Mc Laughlin (1998), pengamatan potensi bioaktivitas ini dilakukan berdasarkan nilai *Lethal Concentration 50%* (LC₅₀) yaitu suatu nilai yang menunjukkan konsentrasi zat toksik yang dapat mengakibatkan kematian organisme sampai 50%. Menurut Meyer (1982), senyawa kimia dikatakan berpotensi aktif atau toksik bila mempunyai LC₅₀ kurang dari 1000 ppm dan dikatakan kurang aktif atau tidak toksik bila mempunyai LC₅₀ lebih dari 1000 ppm.

Berdasarkan hasil uji mortalitas larva udang dari ekstrak kalus tanaman sarang semut seperti yang terlihat pada Tabel 5.4 diperoleh nilai LC₅₀ 5264 ppm untuk pelarut n-heksana, 13863 ppm untuk pelarut etil asetat dan 245 ppm untuk pelarut etanol. Nilai LC₅₀ dari uji mortalitas larva udang diperoleh dengan menggunakan Analisis Probit. Berdasarkan data tersebut diketahui bahwa ekstrak kalus tanaman Sarang Semut pelarut n-heksana dan etil asetat bersifat lemah atau kurang aktif karena LC₅₀ yang diperoleh lebih besar dari 1000 ppm tetapi berbeda dengan ekstrak kalus tanaman sarang semut pelarut etanol bersifat kuat atau aktif karena LC₅₀ yang diperoleh kurang dari 1000 ppm. Jika suatu bahan tanaman toksisitasnya lemah berarti bahan tersebut sangat baik digunakan sebagai antioksidan dan bahan obat.

5.6 Hasil Uji Antibakteri

Hasil indeks daya hambat ekstrak kalus tanaman sarang semut (*M. tuberosa* Jack.) terhadap *S. aureus* dan *S. typhi* dan kategorinya mengacu pada Daviz and Stout (1971) dapat dilihat pada Tabel 5.5 sebagai berikut:

Tabel 5.5 Rata-rata diameter daya hambat (mm) ekstrak kalus tanaman Sarang Semut (*M. tuberosa* Jack.) terhadap *S. aureus* dan *S. typhi* menggunakan pelarut N-heksana, etil asetat dan etanol

Pelarut	Konsentrasi	<i>Staphylococcus aureus</i> (mm)	Kategori	<i>Salmonella typhi</i> (mm)	Kategori
N-heksana	Kontrol (-)	0	Lemah	0	Lemah
	15%	10	Kuat	9	Sedang
	30%	13.5	Kuat	12	Kuat
	45%	18	Kuat	15	Kuat
	60%	21	Sangat Kuat	17	Kuat

	Kontrol (+)	18	Kuat	24	Sangat Kuat
Etil Asetat	Kontrol (-)	0	Lemah	0	Lemah
	15%	0	Lemah	0	Lemah
	30%	12	Kuat	0	Lemah
	45%	13	Kuat	10	Kuat
	60%	15	Kuat	15	Kuat
	Kontrol (+)	18	Kuat	24	Sangat Kuat
Etanol	Kontrol (-)	0	Lemah	0	Lemah
	15%	13	Kuat	13	Kuat
	30%	14	Kuat	14	Kuat
	45%	15	Kuat	15	Kuat
	60%	15	Kuat	16	Kuat
	Kontrol (+)	18	Kuat	24	Sangat Kuat

Diameter Zona Hambat	Respon Hambatan Pertumbuhan
> 20 mm	Sangat Kuat
10-20 mm	kuat
5-10 mm	Sedang
< 5 mm	Lemah

Sumber : Davis and Stout, 1971

Penentuan daya hambat dari ekstrak kalus tanaman Sarang Semut (*M. tuberosa* Jack.) terhadap bakteri *S. aureus* dan *S. typhi* dilakukan dengan cara difusi agar menggunakan metode kertas cakram. Hasil pengujian aktivitas antibakteri ekstrak kalus tanaman sarang semut (*M. tuberosa* Jack.) terhadap bakteri *S. aureus* (dan *S. typhi*) (Tabel 5.5) menunjukkan adanya daya hambat pertumbuhan bakteri. Daerah hambatan pertumbuhan bakteri ditunjukkan dengan adanya zona bening yang terdapat disekeliling kertas cakram. Pengukuran zona hambatan dilakukan dengan mengukur diameter daerah jernih. Semakin tinggi konsentrasi semakin besar zona hambat yang terbentuk.

Aktivitas antibakteri ekstrak kalus tanaman Sarang Semut (*M. tuberosa* Jack.) dalam menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* dan *S. typhi* diduga merupakan pengaruh dari kandungan beberapa senyawa metabolit sekunder yang terkandung di dalam fraksi-fraksi tersebut. Berdasarkan uji skrining fitokimia diketahui bahwa fraksi n-heksana hanya memiliki kandungan metabolit sekunder steroid, fraksi etil asetat memiliki kandungan metabolit sekunder berupa flavonoid, fenolik dan alkaloid dan fraksi etanol hanya memiliki kandungan saponin saja. Setiap fraksi memiliki kandungan senyawa yang berbeda-beda sesuai dengan larutan penyari yang digunakan. Masing-masing senyawa

metabolit sekunder yang terkandung di dalam fraksi tersebut memiliki mekanisme penghambatan pertumbuhan bakteri yang berbeda-beda.

Senyawa metabolit sekunder yang terkandung di dalam ekstrak kalus tersebut berfungsi sebagai bahan aktif yang bersifat sebagai antibakteri, dapat mengganggu proses fisiologis dan menghalangi terbentuknya komponen sel bakteri seperti sintesis dinding sel, membran, sitoplasma, sintesis protein dan sintesis asam nukleat (Subandrio, 1995). Bahan aktif yang memiliki kelarutan tinggi pada pelarut polar, akan lebih mudah menembus lapisan fosfolipid membran sel sehingga lebih cepat mengganggu fungsi fisiologis bakteri dan pada akhirnya sel akan mengalami kematian (Kneblock dkk, 1989).

Mekanisme kerja saponin sebagai antibakteri yaitu dapat meningkatkan permeabilitas membran sel sehingga terjadi hemolisis. Saponin juga dapat mengubah fungsi protein atau glikoprotein di membran sel dan membentuk ikatan dengan kolestrerol untuk merusak struktur fosfolipid membran sel. Saponin pada konsentrasi yang tinggi dapat melubangi sel dan mengganggu permeabilitasnya (Hassan, 2008).

Mekanisme kerja alkaloid yang terkandung pada ekstrak kalus tanaman Sarang Semut (*M. tuberosa* Jack.) sebagai antibakteri yaitu mengganggu terbentuknya komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga dapat mengakibatkan sel bakteri menjadi lisis (Harbone, 1987).

Mekanisme kerja senyawa fenolik yang dimiliki ekstrak kalus tanaman sarang semut mampu merusak membran sel, menginaktivkan enzim dan mendenaturasi protein sehingga dinding sel mengalami kerusakan karena penurunan permeabilitas. Perubahan permeabilitas membran sitoplasma memungkinkan terganggunya transportasi ion-ion organik yang penting ke dalam sel sehingga berakibat terhambatnya pertumbuhan bahkan hingga kematian sel. Dalam konsentrasi tinggi, kandungan fenol menembus dan mengganggu dinding sel bakteri dan mempresipitasi protein dalam sel bakteri. Dalam konsentrasi yang lebih rendah, fenol menginaktivkan sistem enzim penting dalam sel bakteri (Oliver dkk, 2001).

Menurut Chusnie dan Lamb (2005), mekanisme kerja senyawa flavonoid dalam menghambat pertumbuhan bakteri sebagian besar disebabkan oleh penghambatan DNA gyrase. Sophoraflavone G dan (-) - epigallocatechin gallate yang dapat menghambat fungsi membran sitoplasma, sedangkan licochalcones A dan C dapat menghambat metabolisme energi dan menyebabkan penghambatan pertumbuhan bakteri. Madduliri

dkk (2013) menyatakan mekanisme kerja steroid sebagai antibakteri yaitu dengan merusak membran lipid, sehingga liposom mengalami kebocoran. Steroid juga diketahui dapat berinteraksi dengan membran fosfolipid, karena sifatnya yang permeabel terhadap senyawa-senyawa lipofilik menyebabkan integritas membran menurun dan morfologi membran sel terganggu yang mengakibatkan sel mengalami lisis dan rapuh (Ahmed, 2007).

Aktivitas antibakteri ekstrak kalus tanaman Sarang Semut (*M. tuberosa* Jack.) dalam menghambat pertumbuhan bakteri *S. typhi* yang termasuk bakteri Gram negatif berbeda bila dibandingkan dengan bakteri *S. aureus* yang termasuk bakteri Gram positif. Hal ini disebabkan karena dinding sel kedua jenis bakteri tersebut berbeda. Lapisan peptidoglikan yang menyusun dinding sel bakteri Gram positif terdiri dari struktur yang tebal dan kaku serta mengandung substansi dinding sel yang disebut asam teikoat, sedangkan lapisan peptidoglikan yang menyusun dinding sel bakteri Gram negatif tipis sehingga dinding selnya mudah rusak. Peptidoglikan merupakan komponen yang digunakan untuk mempertahankan keutuhan sel. Karena sedikit dan tipisnya lapisan peptidoglikan serta tidak adanya kandungan asam teikoat yang menyusun dinding sel bakteri Gram negatif bakteri Gram negatif menyebabkan dinding selnya lebih rentan mengalami kerusakan ketika diberikan antibakteri (Radji, 2011).

Aktivitas antibakteri ekstrak kalus terhadap bakteri *S. aureus* dan *S. typhi*, pada ketiga jenis pelarut (n-heksan, etil asetat dan etanol) bersifat kuat pada konsentrasi 15-30%. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak kalus tanaman sarang semut mempunyai aktivitas antibakteri yang tinggi terhadap bakteri yang diujikan.

B. LUARAN YANG DICAPAI

1. Jurnal Internasional (accepted/publikasi tahun 2018).

Jurnal Nusantara Bioscience (ISSN: 2087-3948 E-ISSN: 2087-3956), Vol. 10, No. 3, pp. 183-192 Agustus 2018, judul "Effect of sucrose and plant growth regulators on callogenesis and preliminary secondary metabolic of different explant *Myrmecodia tuberosa*"

2. Buku Ajar (terbit tahun 2018)

Judul : Potensi Sarang Semut sebagai Bahan Fitofarmakokimia

Penerbit : Mulawarman University Press

3. Konferensi Nasional : Seminar Nasional IV Biologi dan Pembelajarannya, tanggal 12 Oktober 2018, judul makalah “

- Buku ajar (terbit tahun 2018)
- Konferensi nasional atau international (tahun 2018)

BAB VI. KESIMPULAN

Dari penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Hasil uji fitokimia ekstrak kasar kalus tanaman sarang semut mengandung senyawa metabolit sekunder steroid, flavonoid, fenolik, alkaloid dan saponin. Ekstrak kalus pada pelarut fraksi heksan mengandung steroid; fraksi etil asetat mengandung flavonoid, fenolik dan alkaloid sedangkan fraksi etanol sisa mengandung saponin.
2. Nilai TPC (Total Phenolic Content) dan TFC (Total Flavonoid Content) kalus paling tinggi terdapat pada pelarut etil asetat yaitu TPC 173,800 mg GAE/g dan TFC 83,027 mg CE/g.
3. Aktivitas antioksidan kalus tertinggi terdapat pada pelarut etil asetat dengan nilai IC₅₀ 41,430 µg mL⁻¹.
4. Aktivitas antibakteri ekstrak kalus terhadap bakteri *S. aureus* dan *S. typhi*, pada ketiga jenis pelarut (n-heksan, etil asetat dan etanol) bersifat kuat pada konsentrasi 15-30%.
5. Ekstrak kalus tanaman sarang semut pada pelarut n-heksan dan etil asetat bersifat lemah (tidak toksik), sedangkan pada pelarut etanol bersifat kuat (toksik).

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad, R; E. N. M. Mahbob; Z. M. Noo; N. H. Ismail; N. H Lajis and K. Shaari. 2010. Evaluation of Antioxidant Potential of Medicinal Plants from Malaysian Rubiaceae (Subfamily Rubioideae). African Journal of Biotechnology. 9 (46): 7948-7954.
- Ahmed, B. 2007. Chemistry of Natural Products. New Delhi: Departemen of Pharmaceutical Chemistry of Science. Jamia Hamdard.
- Bhatia S, Dahiya R. 2015. Chapter 4 - concepts and techniques of plant tissue culture science. In: Bera SBS (ed) Modern applications of plant biotechnology in pharmaceutical sciences. Academic Press, Boston, pp 121-156. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-802221-4.00004-2>

- Bouftira, I., Abdelly, C. & Sfar, S. 2012. Antioxidant and Antibacterial Properties of *Mesembryanthemum crystallinum* and *Carpobrotus edulis* Extracts. *Advances in Chemical Engineering and Science*. 2: 359-365.
- Chusnie, T.T.P. and Lamb, A.J., 2005, Antimicrobial activity of flavonoid. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26: 343–356).
- Dewi, A. K. 2013. Isolation, Identification and Sensitivity test of *Staphylococcus aureus* against Amoxicillin of the Milk Sample in the Mastitis Crossbreed Ettawa Goat at Girimulyo Area, Kulonprogo, Yogyakarta. *Jurnal Sain Veteriner*, 31:138-150.
- Engida A. M; N. S Kasim; Y. A. Tsigie and S. Ismadji. 2013. Extraction, Identification and Quantitative HPLC Analysis of Flavonoids from Sarang Semut (*Myrmecodia pendens*). *Journal Industrial Crops and Product* 41: 392-396.
- George, E. F. and P. D. Sherrington. 1984. *Plant Propagation by Tissue Culture (Handbook and Directory of Commercial Laboratories)*. Eastern Press. England.
- Hassan, SM. 2008. *Antimicrobial Activities of Saponin Rich Guar Meal Extract*. Texas: Texas A&M University.
- Harborne, J. B. 1987. *Metode Fitokimia (Penuntun Cara Modern Menganalisis Tanaman)*. (diterjemahkan oleh Kosasih, P dan S. Iwang): ITB, Bandung.
- Harborne, J. B. & Williams, C. A. 2000. *Advances In Flavonoids Research Since 1992. Phytochemistry*, 55:481-504.
- Hendra. 2008. Tentang Sarang Semut. <http://iqraherba.blogspot.com/2008/08>. Diakses tanggal 3 November 2011.
- Huxley, C. R. 1978. The Ant-Plant *Myrmecodia* and *Hydnophytum* (Rubiaceae), and The Relationships between Their Morphology, Ant Occupants, Physiology and Ecology. *The New Phytologist* 80(1): 231-268.
- Imran, M. M; M. M. Raja; A. J. Basith and A. Asaruden. 2011. Determination of total phenol, flavonoid and antioxidant activity of edible mushrooms *Pleurotus florida* and *Pleurotus eous*. *International Food Research Journal* 18: 574-577.
- Kneblock, K.A., A. Pauli., B. Iberl, H. Weigland., N. Weis. 1989. Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oil Components. *J. Essensial Oil Res*; 1989.
- Lisdawati, V., S. Wiryowidagdo., L. B. S. Kardono. 2006. *Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) dari Berbagai Fraksi Ekstrak Daging Buah dan Kulit Biji Mahkota Dewa (Phaleria marcocarpa)*. Panel Kesehatan Volume 34 (3).
- Madduliri, Suresh, Rao, K. Babu. Sitaram, B. 2013. In vitro evaluation of five Indegenous plants extract Againts five bacterial Phatogens of Human. *International Journal of Pharmacy and Phrmaceutical Science* 5(4): 679-684.
- Manoi, F. 2008. Sarang Semut (*Myrmecodia*) Tanaman Obat Berpotensi Menyembuhkan Berbagai Penyakit. *Warta Penelitian dan Pengembangan Tanaman Industri* 14 (1).
- Marinova, G. & Batchvarov, V. 2011. Evaluation Of The Methods For Determination Of The Free Radical Scavenging Activity By DPPH. *Journal of Agricultural Science*, 17:11-24.
- Molyneux, P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Original Article*, 26:211-219.
- Moshi, M. J., E. Innocent, J. J. Magadula, D. F. Otieno, A. Weisheit, P. K. Mbabazi dan R.S.O.Nondo. 2010. Brine Shrimp Toxicity of Some Plants Used As Traditional Medicines In Kagera Region, North Western Tanzania. *Tanzania Journal of Health Research*. 12 (1).

- Muharrama, A. R. W., Syawal, H. & Lukistyowati, L. 2013. Sensitivitas Ekstrak Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) Terhadap Bakteri *Streptococcus agalactiae*. *Journal of Aquaculture Management and Technology*, 3:1-10.
- Orak, H. H. 2007. Total Antioxidant Activities, Phenolics, Anthocyanins, Polyphenoloxidase Activities of Selected Red Grape Cultivars and Their Correlations. *Scientia Horticulturae*. 111(3): 235–241.
- Oliver, S. P., B. E. Gillespie, M. J. Lewis, S. J. Ivey, R. A. Almeida, D. A. Luther, D. L. Johnson, K. C. Lamar, H. D. Moorehead and H. H. Dowlen. 2001. Efficacy of a new premilking teat disinfectant containing a phenolic combination for the prevention of mastitis. *J. Dairy Sci.* 84: 1545-1549.
- Parinding, Z. 2007. *Potensi dan Karakteristik Bio-Ekologis Tumbuhan Sarang Semut di Taman Nasional Wasur Merauke Papua*. Sekolah Pascasarjana Bogor: Institut Pertanian Bogor: Bogor.
- Prachayasittikul S; P. Buraparuangsang; A. Worachartcheewan; C. Isarankura-Na-Ayudhya, S. Ruchirawat and V. Prachayasittikul. 2008. Antimicrobial and Antioxidative Activities of Bioactive Constituents from *Hydnophytum formicarum* Jack. *Journal Molecules*. ISSN 1420-3049. 13:904-921.
- Radha RK, Shereena SR, Divya K, Krisnan PN, Seeni S. 2011b. In vitro propagation of *Rubia cordifolia* Linn. A medicinal plant of the western ghats. *Int J Bot* 7:90-96
- Radji, M. 2011. Mikrobiologi. Buku Kedokteran. ECG : Jakarta.
- Robinson, T. 1995. Kandungan Organik Tanaman Tinggi. ITB, Bandung.
- Salisbury, F.B. dan C. W. Ross. 1995. Fisiologi Tanaman. Jilid 3. (diterjemahkan oleh Diah R.L dan Sumaryono). ITB, Bandung.
- Salimi, Y. K dan Bialangi, N. 2014. Kajian Senyawa Antioksidan dan Antiinflamasi Tumbuhan Obat Binahong (*Andreadera cordifolia* (Ten.) Steenis) Asal Gorontalo. *Laporan Tahunan, Penelitian Hibah Fundamental : Universitas Gorontalo*, Gorontalo.
- Shi D. 2014. Effects of culture media and plant growth regulators on micropropagation of Willow (*Salix matsudana* 'Golden Spiral) and Hazelnut (*Corylus colurna* 'Te Terra Red). University of Nebraska.
- Sirait 2007. Penuntun Fitokimia dalam Farmasi. Bandung: ITB.
- Soeksmanto, A; M. A. Subroto; H. Wijaya dan P. Simanjuntak. 2010. Anticancer Activity Tes for Extracts of Sarang Semut Plant (*Myrmecodia pendens*) to HeLa and MCM-Ba Cells. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 13 (3): 148-151.
- Subandrio, W.K.A. 1995. Kemoterapi Antimikroba, Antibiotika. Fakultas MIPA Universitas Indonesia.
- Subroto, M. A dan H. Saputro. 2008. Gempur Penyakit Dengan Sarang Semut. Penebar Swadaya, Jakarta.
- Suryowinoto, M. 1996. Pemuliaan Tanaman Secara *In Vitro*. Kanisius, Yogyakarta.
- Urmi, K.F., S. Mostafa, G. Begum dan K. Hamid. 2013. Comparative Brine Shrimp Lethality Bioassay of Different Plant Parts of *Bauhinia Purpurea* L. *Journal of Pharmaceutical Science and Research*. 5 (10): 190-192.
- Waluyo, L. 2008. *Teknik dan Metode Dasar Dalam Mikrobiologi*. UMM: Malang.
- Yusnita, 2003. Kultur Jaringan Cara Memperbanyak Tanaman Secara Efisien. Agromedia Pustaka, Bogor.

LAMPIRAN 1. JUSTIFIKASI ANGGARAN PENELITIAN

Pertimbangan Alokasi Biaya Tahun II

1. Anggaran untuk upah pelaksana

1. Anggaran untuk upah pelaksana

No	Jenis Tenaga	Banyak								Satuan harga (Rp)	Jumlah (Rp)	
		Org/Bln/Jam/ Penelitian										
1	Laboran	1	org	x	7	bln				x	420.000	2.940.000
2	Sekretariat peneliti	3	org	x	7	bln					300.000	6.300.000
3	Pengolah data	6	org	x	1	Penelitian					1.540.000	9.240.000
Jumlah Keseluruhan											18.480.000	

2. Anggaran Bahan Habis Pakai

2.1 Pembelian Bahan habis Pakai

No	Material	Jumlah	Unit	Satuan harga (Rp)	Jumlah (Rp)
A. BAHAN UNTUK FRAKSINASI					
1	n- heksan	2	L	3,200,000	6,400,000
2	Etil Asetat	2	L	2,900,000	5,800,000
3	Etanol	6	L	1,720,000	10,320,000
B. BAHAN UNTUK ANALISA TPC (Total Phenolik Content)					
1	Asam Galat	500	g	21,000	10.500.000
2	Metanol	2	L	1,400,000	2,800,000
3	Folin-Ciocalteau	250	ml	12.700	3.175.000
4	Na ₂ CO ₃	2	kg	995,000	1.990.000
C. BAHAN UNTUK ANALISA TFC (Total Fenolik Content)					
1	AlCl ₃	500	gram	792,000	3,960,000
2	CH ₃ COOH	1	L	1,400,000	1,400,000
3	Catechin	500	gram	1,000,000	1,000,000
D. BAHAN UNTUK UJI ANTIOKSIDAN					
1	DPPH	500	mg	11,540	5,770,000
2	Vitamin C	100	g	65,500	6,550,000
E. BAHAN UNTUK UJI ANTIMIKROBA					
1	Biakan murni 2 sel bakteri	2	Jenis	950.000	1.900.000
2	Media MHA 500 gram	1	Kg	1,800,000	1,800,000

F. BAHAN UNTUK UJI TOKSISITAS					
1	Larva <i>Artemia salina</i>	1	Paket	1.250.000	1.250.000
2	Pembuatan aquarium	2	Unit	1.500.000	3.000.000
Jumlah					67.615.000

2.2. Pengeluaran Lain

No	Bahan	Volume	Lama	Biaya Satuan (Rp)	Biaya (Rp)
1	Pendaftaran Lokakarya/Seminar	1	kegiatan	1,650,000	1,750,000
2	Pembuatan Poster	1	kegiatan	1,400,000	2.250.000
3	Konsumsi kegiatan	1	kegiatan	3,780,000	6.000.000
4	Alat Tulis Kantor	1	kegiatan	6,500,000	9.105.000
5	Penggandaan/Foto copy/Penulisan laporan	1	kegiatan	7,186,000	7.987.000
6	Dokumentasi	1	kegiatan	2,500,000	5.000.000
JUMLAH					34.192.000

3. Perjalanan

3. Perjalanan

No	Perjalanan	Kuantitas	Keterangan	Biaya Satuan (Rp)	Biaya (Rp)
1	Seminar Nasional (1 Orang)				
	Pesawat	1	PP	5.233.000	5.233.000
	Transport Mobil	1	PP	500,000	1,000,000
	Bandara - Hotel	1	PP	200.000	400.000
	Harian	1	3	370.000	1.110.000
	Penginapan	1	2	850.000	1.700.000
2	Seminar Internasional (1 Orang)				
	Transport Mobil	1	PP	500,000	1,000,000
	Harian	1	4	430,000	1,720,000
	Penginapan	1	3	850,000	2.550.000
Jumlah					14.713.000

1. Upah Pelaksana	18.480.000
2. Bahan habis pakai	67.615.000
3. Perjalanan	14.713.000
4. Pengeluaran lain	34.192.000
Jumlah anggaran tahun kedua	135,000,000

REKAPITULASI ANGGARAN TAHUN KEDUA

No	Keterangan	Jumlah (Rp)
I	Biaya Penelitian	
1	Honorarium	14.840.000
2	Bahan Habis Pakai	67.615.000
3	Perjalanan	14.713.000
4	Pengeluaran lain	34.192.000
	Total Biaya Penelitian	135,000,000
II	Biaya Tambahan	
	Penerbitan Buku	15,000,000
	Grand Total	150,000,000

LAMPIRAN 2. KETERSEDIAAN SARANA DAN PRASARANA PENELITIAN

1. Laboratorium

Penelitian ini akan dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman, FMIPA Universitas Mulawarman Samarinda, uji metabolit sekunder dilakukan di Laboratorium Biokimia FMIPA Universitas Mulawarman dan Uji Antibakteri dan Uji Toksisitas dilakukan di laboratorium Mikrobiologi dan Genetika Molekuler.

2. Peralatan Utama

No	Jenis Alat	Tempat	Kondisi
1	Laminar Air Flow	Lab. Kultur Jaringan FMIPA UNMUL	Bagus
2	pH meter	Lab. Kultur Jaringan FMIPA UNMUL	Bagus
3	Autoklaf	Lab. Kultur Jaringan FMIPA UNMUL	Bagus
4	Spektrofotometer UV/VIS	Lab. Fisiologi FMIPA UNMUL	Bagus
5	Rotary Evaporator	Lab. Anatomi Fisiologi FMIPA UNMUL	Bagus
6	Timbangan Analitik	Lab. Kultur Jaringan, FMIPA UNMUL	Bagus
7	<i>freeze drying</i> (Christ Alpha 1-2 LD)	Lab Fisiologi FMIPA UNMUL	Bagus

8	Inkubator	Lab. Mikrobiologi dan Genetika Molekuler	Bagus
---	-----------	--	-------

LAMPIRAN 3. SUSUNAN ORGANISASI TIM PENELITI DAN PEMBAGIAN TUGAS

No	Nama/NIDN	Instansi Asal	Bidang Ilmu	Alokasi Waktu	Uraian Tugas
1	Dr. Yanti Puspita Sari M. Si.	Biologi FMIPA UNMUL	Kultur Jaringan	9 jam/ Minggu	Tugas utama Ketua Peneliti berkaitan dengan teknis penelitian yang dilakukan adalah sebagai Berikut <ul style="list-style-type: none"> • Persiapan alat dan bahan uji • Uji sampel secara in vitro • Sampling data • Analisis data • Penulisan progress report • Penulisan laporan • Seminar • Jurnal international/nasional
2	Eko Kusumawati, S.Si, MP	Biologi FMIPA UNMUL	Mikrobiologi	9 jam/ Minggu	Tugas anggota penelitian <ul style="list-style-type: none"> • Membantu peneliti utama dalam persiapan alat dan bahan • Uji antimikroba • Sampling data • Analisis data • Pembuatan progress report • Laporan penelitian • Penulisan seminar dan jurnal (nasional terakreditasi dan/international)
3	Dr. Chairul Saleh, M.Si	Kimia FMIPA UNMUL	Ilmu Kimia	9 jam/ Minggu	Tugas anggota penelitian <ul style="list-style-type: none"> • Membantu peneliti utama dalam persiapan alat dan bahan • Ekstraksi dan fraksinasi bahan uji • Uji antioksidan • Sampling data • Analisis data • Pembuatan progress report • Laporan penelitian

					• Penulian seminar dan jurnal (nasional terakreditasi dan/international)
--	--	--	--	--	--

LAMPIRAN 4. BIODATA PENGUSUL PENELITIAN UNGGULAN PERGURUAN TINGGI

1. KETUA PENELITI

A. Identitas Diri

1	Nama Lengkap (dengan gelar)	Dr. Yanti Puspita Sari, M. Si
2	Jabatan Fungsional	Lektor Kepala
3	Jabatan Struktural	-
4	NIP/NIK/No. Identitas lainnya	19740304 200012 2 001
5	NIDN	0004037404
6	Tempat dan Tanggal Lahir	Padang, 4 Maret 1974
7	Alamat rumah	Jl. Pakis Merah 15. No 590, Blok D, Bengkuring, Samarinda
8	No. Telepon/Faks/Hp	081253958381
9	Alamat kantor	Jl. Barong Tongkok No.4. Kampus Gn. Kelua FMIPA Universitas Mulawarman Samarinda
10	Nomor telp/Faks	(0541) 749 152 / (0541) 749 140
11	Alamat e-mail	ypsman2002@yahoo.com
12	Lulusan yang telah dihasilkan	S1 = 35 orang; S2 = - orang; S3 = - orang
13	Mata Kuliah yang diampu	1. Kultur Jaringan Tanaman 2. Morfologi Tanaman 3. Biologi Sel dan Molekuler 4. Pemuliaan Tanaman

B. Riwayat Pendidikan

	S1	S2
Nama Perguruan Tinggi	Universitas Andalas	Institut Pertanian Bogor
Bidang Ilmu	Biologi	Biologi
Tahun Masuk-Lulus	1993-1998	1999-2003
Judul Skripsi/Thesis/Disertasi	Kultur Kalus Padi Gogo (<i>Oryza sativa</i> L.) dan Toleransinya terhadap Kadar Garam (NaCl)	Isolasi dan Kultur Protoplas Tanaman Cabai (<i>Capsicum annum</i> L.)
Nama Pembimbing/Promotor	Dra. Hj. Netty W.S, MS	Dr. Ir. Suharsono, DEA

C. Pengalaman Penelitian Dalam 5 Tahun Terakhir

No	Tahun	Judul Penelitian	Pendanaan	
			Sumber	Jumlah (Juta, Rp.)
1	2015	Modifikasi Konsentrasi Sukrosa Pada Media Padat dan Cair Untuk Pertumbuhan Kalus Tanaman Sarang Semut (<i>Myrmecodia tuberosa</i> Jack.) Secara <i>In Vitro</i> .	Mandiri	-
2	2017	Potensi Ekstrak Kalus Tanaman Sarang Semut (<i>Myrmecodia tuberosa</i> Jack) Hasil <i>In Vitro</i> Sebagai Antioksidan dan Antimikroba	Kemenristek Dikti	112.965.000
3	2018	Potensi Ekstrak Kalus Tanaman Sarang Semut (<i>Myrmecodia tuberosa</i> Jack) Hasil <i>In Vitro</i> Sebagai Antioksidan dan Antimikroba	Kemenristek Dikti	135.000.000

D. Pengalaman Pengabdian Kepada Masyarakat dalam 5 Tahun terakhir

No	Tahun	Judul Pengabdian Kepada Masyarakat	Pendanaan	
			Sumber	Jumlah (Juta, Rp.)
-	-	-	-	-

E. Pengalaman Penulisan Artikel Ilmiah Dalam Jurnal Dalam 5 Tahun Terakhir

No	Tahun	Judul Artikel Ilmiah	Volume/Nomor	Nama Jurnal
1	2011	Mikropropagasi Tanaman Anggrek Tebu (<i>Grammatophyllum speciosum</i> BL.) secara <i>In Vitro</i> dari Sumber Eksplan Tunas Pucuk pada Media MS (Murashige-Skoog) dengan Penambahan Madu (Yanti PS, Hetty M, Vicky N)	Vol. 10 No I. April 2011	Jurnal Mulawarman Scientifie. ISSN : 1412-498X.
2	2011	Pengaruh Pemberian Air Kelapa terhadap Pertumbuhan Anggrek Kantong Semar (<i>Paphiopedilum supardii</i> Braem & Loeb) pada Media Knudson secara <i>In Vitro</i> . (Yanti PS, Hetty M, Aspiah)	Vol. 10. No 2 Oktober 2011	Jurnal Mulawarman Scientifie. ISSN 1412-498X.

3	2013	Pengaruh Kombinasi Media Tanam dan Pemupukan terhadap Pertumbuhan Biji Tanaman Sarang Semut (<i>Myrmecodia tuberosa</i> Jack.) (Yanti PS, Dwi S, Eva A)	Vol 6 No 1 April 2013	Jurnal Biologi Lingkungan.. Al-Kauniyah. ISSN : 1978-3736.
4	2015	Modifikasi Konsentrasi Sukrosa Pada Media Padat dan Cair Untuk Pertumbuhan Kalus Tanaman Sarang Semut (<i>Myrmecodia tuberosa</i> Jack.) Secara <i>In Vitro</i> .(Yanti PS, Ratna K)	Vol.1 No.1 Januari 2015.	Jurnal BioWallacea. Jurnal Ilmiah Ilmu Biologi. ISSN: 2442-2622.
5	2016	Micropropagation Of <i>Myrmecodia tuberosa</i> Jack.:A Medicinal Plant From Borneo	Vol. 5, Issue 09, September 2016	International Journal Of Scientific & Technology Research ISSN 2277-8616
6	2017	Short Communication: The Potential Of Secondary Metabolites Of <i>Myrmecodia tuberosa</i> from different host trees	Vol. 9, No. 2, pp. 170-174 May 2017	Nusantara Bioscience ISSN: 2087-3948 E-ISSN: 2087-3956
7	2018	Effect of sucrose and plant growth regulators on callogenesis and preliminary secondary metabolic of different explant <i>Myrmecodia tuberosa</i>	Vol. 10, No. 3, pp. 183-192 Agustus 2018	Nusantara Bioscience ISSN: 2087-3948 E-ISSN: 2087-3956

F. Pengalaman Penyampaian Makalah Secara Oral Pada Pertemuan/Seminar Ilmiah Dalam 5 Tahun terakhir ini

No	Nama Pertemuan Ilmiah/Seminar	Judul Artikel Ilmiah	Waktu dan Tempat
1	Seminar Kimia Nasional. “Peran Kimia dalam Pembangunan Agro-Industri dan Energi”	Perbanyakkan Tanaman Sarang Semut (<i>Myrmecodia tuberosa</i> Jack) secara <i>In Vitro</i>	3 Desember 2011, Samarinda
2	Peningkatan Kompetensi Pengawas Benih Tanaman	Kultur Jaringan	28-29 Maret 2012. UPTD. Tanaman

			Pangan Samarinda.
3.	Seminar Nasional Biologi Wallacea 2014. “Melihat Wallacea dan Indonesia dari Sunda Kecil”.	Modifikasi Konsentrasi Sukrosa Pada Media Padat dan Cair Untuk Pertumbuhan Kalus Tanaman Sarang Semut (<i>Myrmecodia tuberosa</i> Jack.) Secara <i>In Vitro</i> .	Lombok. 2-3 Desember 2014
4	Seminar Sains Dan Teknologi	Peran Kultur Jaringan dalam Bioteknologi Modern	FMIPA, UNMUL, Samarinda, 19 Maret 2016
5	Seminar Nasional 2017	Pengaruh Sukrosa terhadap pembentukan Kalus <i>Myrmecodia Tuberosa</i> Jack.	Menado, 26 agustus 2017
6	Seminar Nasional 2018	AKTIVITAS ANTIBAKTERI DAN TOKSISITAS EKSTRAK KALUS <i>Myrmecodia Tuberosa</i> Jack.	Medan 12 Oktober 2018
7	Seminar Internasional 2018	POTENTIAL ANTIOXIDANTS CALLUS ANT NEST PLANT (<i>Myrmecodia Tuberosa</i> Jack)	Balikpapan, 24 Oktober 2018

G. Pengalaman Penulisan Buku Dalam 5 Tahun Terakhir

No	Tahun	Judul Buku	Jumlah Halaman	Penerbit
-	-	-	-	-

H. Pengalaman Perolehan HKI Dalam 5 Tahun Terakhir

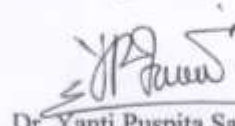
No	Tahun	Judul/Tema HKI	Jenis	Nomor P/ID
-	-	-	-	-

Semua data yang saya isikan dan tercantum dalam biodata ini adalah benar dan dapat dipertanggungjawabkan secara hukum. Apabila di kemudian hari ternyata dijumpai ketidaksesuaian dengan kenyataan, saya sanggup menerima sanksi.

Demikian biodata in saya buat dengan sebenarnya untuk memenuhi salah satu persyaratan dalam pengajuan Hibah penelitian dasar unggulan perguruan tinggi.

Samarinda, 14 Desember 2017

Ketua Pengusul



Dr. Yanti Puspita Sari, M.Si

NIP. 19740304 200012 2 001

2. ANGGOTA PENELITI

A. Identitas diri

1	Nama lengkap (dengan Gelar	Eko Kusumawati, S.Si, MP
2	Jabatan Fungsional	Asisten Ahli
3	Jabatan Struktural	-
4	NIP/NIK/No. Identitas lainnya	19820413 201212 2 001
5	NIDN	0013048209
6	Tempat/tanggal lahir	Tanah Grogot Kab. Paser, 13 April 1982
7	Alamat Rumah	Jl. Nusa Indah Rt.36 No.24 Gn. Sari Ilir Balikpapan
8	No. Telepon/Faks/Hp	081393811793
9	Alamat kantor	Jl. Barong Tongkok Kampus Gn Kelua
10	No. telp / Fax	(0541) 749152 / (0541) 749140
	E-mail	ike_dara@yahoo.co.id
12	Lulusan yang telah dihasilkan	S1 = 8 orang; S2 = - orang; S3 = - orang
13	Mata Kuliah yang diampu	1. Mikrobiologi 2. Mikrobiologi Industri 3. Mikrobiologi Pangan 4. Mikologi 5. Fitopatologi

B. Riwayat Pendidikan

	S1	S2
Nama PT	Univ. Mulawarman	Univ. Brawijaya
Bidang Ilmu	Biologi	Bioteknologi Agroindustri
Tahun Masuk	2001	2007
Tahun Lulus	2007	2009
Judul Skripsi/Tesis/ Disertasi	Pengaruh NAA dan BAP terhadap Inisiasi Tunas Mengkudu	Skrining, Identifikasi dan Aplikasi Bakteri Untuk Bioremediasi Lahan Tercemar Minyak Bumi (<i>Crude Oil</i>) menggunakan Teknologi <i>Biopile</i>
Nama Pembimbing/ Promotor	Yanti Puspita Sari, S.Si, M.Si & Titin Purnaningsih, S.Si, M.Si	Dr. Ir. Wignyanto, M.Si & Dr. -ing. M. Abdul Kholiq, M.Sc.

C. Pengalaman Penelitian dalam 5 Tahun Terakhir

No	Tahun	Judul penelitian	Pendanaan	
			Sumber	Jumlah (Juta, Rp)
1.	2016	Isolasi, identifikasi dan skrining bakteri pereduksi sulfat dari sedimen kolam bekas tambang batubara sebagai agen potensial bioremediasi	BOPTN Fakultas MIPA	18.750.000

2	2014	Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun kecombrang (<i>Etlintera elatior</i> (Jack) R.M. Smith) terhadap bakteri <i>Bacillus cereus</i> dan <i>Escherichia coli</i> menggunakan metode difusi sumur	Mandiri	
3	2017	Potensi Ekstrak Kalus Tanaman Sarang Semut (<i>Myrmecodia tuberosa</i> Jack) Hasil <i>In Vitro</i> Sebagai Antioksidan dan Antimikroba	Kemenristek Dikti	112.965.000
4	2018	Potensi Ekstrak Kalus Tanaman Sarang Semut (<i>Myrmecodia tuberosa</i> Jack) Hasil <i>In Vitro</i> Sebagai Antioksidan dan Antimikroba	Kemenristek Dikti	135.000.000

D. Pengalaman Pengabdian Kepada Masyarakat dalam 5 Tahun Terakhir

No	Tahun	Judul Pengabdian Kepada Masyarakat	Pendanaan	
			Sumber	Jumlah (Juta, Rp.)
-	-	-	-	-

E. Pengalaman Penulisan Artikel Ilmiah dalam Jurnal

No	Tahun	Judul artikel ilmiah	Nama Jurnal	Volume/ Nomor
1	April 2016	Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun kecombrang (<i>Etlintera elatior</i> (Jack) R.M. Smith) terhadap bakteri <i>Bacillus cereus</i> dan <i>Escherichiacoli</i> menggunakan metode difusi sumur	Polhasains No. ISSN : 2337-8492	Vol. 4/ No. 1
2	Mei 2015	Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Kecombang (<i>Etlintera elatior</i> (Jack) R.M.Sm) Terhadap <i>Salmonellatyphi</i>	Manuntung No. ISSN : 2443-115X	Vol. 1/ No. 1
3	April 2015	Aplikasi Bakteri Untuk Bioremediasi Lahan Tercemar Minyak Bumi (Crude Oil) Menggunakan Teknologi <i>Biopile</i>	Polhasains No. ISSN : 2337-8492	Vol. 3/ No. 1
4	Oktober 2013	Skrining dan Identifikasi Bakteri Untuk Bioremediasi Lahan Tercemar Minyak Bumi (<i>CrudeOil</i>)	Mulawarman Scientifie No. ISSN : 1412-498X	Vol. 12/ No. 2
5	2018	Effect of sucrose and plant growth regulators on callogenesis and preliminary secondary metabolic of	Vol. 10, No. 3, pp. 183-192 Agustus 2018	Nusantara Bioscience

		different explant <i>Myrmecodia tuberosa</i>		ISSN: 2087-3948 E-ISSN: 2087-3956
--	--	--	--	--

F. Pengalaman Penyampaian Makalah Secara Oral Pada Pertemuan/Seminar Ilmiah Dalam 5 Tahun terakhir ini

No	Nama Pertemuan Ilmiah/Seminar	Judul Artikel Ilmiah	Waktu dan Tempat
-	-	-	-

G. Pengalaman Penulisan Buku Dalam 5 Tahun Terakhir

No	Tahun	Judul Buku	Jumlah Halaman	Penerbit
1	2018	Potensi Sarang Semut sebagai Bahan Fitofarmakokimia	120	Mulawarman University Press

H. Pengalaman Perolehan HKI Dalam 5 Tahun Terakhir

No	Tahun	Judul/Tema HKI	Jenis	Nomor P/ID
-	-	-	-	-

Semua data yang saya isikan dan tercantum dalam biodata ini adalah benar dan dapat dipertanggungjawabkan secara hukum. Apabila di kemudian hari ternyata dijumpai ketidaksesuaian dengan kenyataan, saya sanggup menerima sanksi.

Demikian biodata in saya buat dengan sebenarnya untuk memenuhi salah satu persyaratan dalam pengajuan Hibah penelitian dasar unggulan perguruan tinggi.

Samarinda, 14 Desember 2017

Anggota Pengusul I



Eko Kusumawati, S.Si, MP

NIP. 19820413 201212 2 001

3. ANGGOTA PENELITIAN

A. Data Pribadi

1	Nama Lengkap (dengan gelar)	Dr. Chairul Saleh, S.Si., M.Si
2	Jabatan Fungsional	Lektor Kepala
3	Jabatan Struktural	Kepala Laboratorium Kimia Dasar FMIPA UNMUL
4	NIP/NIK/No. Identitas lainnya	197303312000121001
5	NIDN	0031037302
6	Tempat dan Tanggal Lahir	Tanjung Balai, 31 Maret 1973
7	Jenis Kelamin	Laki-laki
8	Alamat Rumah	Jl. Ery Suparjan No. 84 RT. 12 Sempaja Selatan
9	Nomor Telepon/Faks/HP	081396060118
10	Alamat Kantor	Jl. Barong Tongkok Kampus Gn Kelua Samarinda
11	Nomor Telepon/Faks	(0541) 749140, 749152, 749153, 749156
12	Alamat e-mail	chairul.unmul@gmail.com
13	Mata Kuliah yg diampu	Kimia Organik Kimia Organik Fisik Kimia Bahan Obat Kimia Organik Bahan Alam Elusidasi Struktur

B. Riwayat Pendidikan

Program	S-1	S-2	S-3
Nama Perguruan Tinggi	Univ. Sumatera Utara	Univ. Padjadjaran	Univ. Sumatera Utara
Bidang Ilmu	FMIPA/Kimia	Ilmu Kimia/ Kimia Organik	Ilmu Kimia
Tahun Masuk-Lulus	1992-1998	1999-2002	2003-2007
Judul Skripsi/Tesis/Disertasi	Determination of Maltose Contents Resulting from Hydrolysis of Gelatinised Hydropropyl Rice Starches by using Men's Saliva of Smoker and Non Smoker on Spectrophotometry	Isolasi Senyawa Steroid dari Tumbuhan Sidawayah (<i>Woodfordia floribunda</i> Salisb.)	Isolasi dan Penentuan Struktur Senyawa Steroid dari Akar Tumbuhan Cendana (<i>Santalum album</i> Linn.)
Nama Pembimbing/Promotor	Drs. Daniel Dongoran, M.Sc	Prof. Dr. Supriyatna, M.Sc., Apt	Prof. Dr. Tonel Barus

C. Pengalaman Penelitian Dalam 5 Tahun Terakhir

No	Tahun	Judul Penelitian	Pendanaan	
			Sumber	Jumlah (Juta, Rp.)
1.	2015	Skrining Gen Pengkode Polysaccharide deacetylase (PDA) dari Bakteri Penghasil Enzim Chitinolitik sebagai Enzim Potensial dalam Deasetilasi Limbah Chitin Menjadi Chitosan dan Derivatnya	Fundamental DIKTI	150 juta
2.	2016	Pemanfaatan Ekstrak Daun Afrika (<i>Vernonia amigdalina</i> Delii) sebagai Antihiperurisemia (Asam Urat) pada Mencit Putih Jantan	Fundamental DIKTI	150 juta
3	2017	Potensi Ekstrak Kalus Tanaman Sarang Semut (<i>Myrmecodia tuberosa</i> Jack) Hasil <i>In Vitro</i> Sebagai Antioksidan dan Antimikroba	Kemenristek Dikti	112.965.000
4	2018	Potensi Ekstrak Kalus Tanaman Sarang Semut (<i>Myrmecodia tuberosa</i> Jack) Hasil <i>In Vitro</i> Sebagai Antioksidan dan Antimikroba	Kemenristek Dikti	135.000.000

D. Pengalaman Pengabdian Kepada Masyarakat dalam 5 Tahun Terakhir

No	Tahun	Judul Pengabdian Kepada Masyarakat	Pendanaan	
			Sumber	Jumlah (Juta, Rp.)
-	-	-	-	-

E. Pengalaman Penulisan Artikel Ilmiah Dalam Jurnal Dalam 5 Tahun Terakhir

No	Tahun	Judul Artikel Ilmiah	Volume/ Nomor	Nama Jurnal
1.	2012	Senyawa Steroid dari Daun Kukang (<i>Lepisanthes amoena</i> [Hassk.] Leenh.)	Volume 12/ Nomor 1	Mulawarman Scientifie
2.	2012	Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kasar Metanol, Fraksi n-Heksana, Etil Asetat dan Metanol dari Akar Tanaman Senduduk (<i>Melastoma affine</i>)	Volume 10/ Nomor 1	Jurnal Kimia Mulawarman

		Don) terhadap Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> dan <i>Eschericia coli</i>		
3.	2012	Pemodelan Molekul Senyawa <i>Mycosporine-Like Amino Acid (MAAs-Like)</i> sebagai Senyawa Penyerap Sinar UV Menggunakan Metode <i>Ab-Initio</i>	Volume 10/ Nomor 1	Jurnal Kimia Mulawarman
4.	2012	Karakterisasi Senyawa Triterpena dari Akar Tumbuhan Karamunting (<i>Melastoma affine</i> D. Don.)	Volume 10/ Nomor 1	Jurnal Kimia Mulawarman
5.	2014	Uji Fitokimia, Toksisitas dan Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kasar Etanol, Fraksi n-Heksana, Etil Asetat dan Etanol-Air dari Daun Senduduk Bulu (<i>Clidemia hirta</i> (L.) D. Don) Terhadap Bakteri <i>S. Aureus</i> dan <i>E. coli</i>	Volume 1/ Nomor 8	Journal Science East Borneo
6.	2015	Uji Toksisitas (<i>Brine Shrimp Lethality Test</i>) dan Uji Aktivitas Antibakteri Daun Kembang Bulan (<i>Tithonia diversifolia</i> A. Gray) Terhadap Bakteri <i>S. Aureus</i> dan <i>E. Coli</i>	Volume 2/ Nomor 8	Journal Science East Borneo
7.	2015	Aktivitas Antihiperlikemik dari Ekstrak Etanol dan n-Heksana Daun Kembang Bulan (<i>Tithonia diversifolia</i> A. Gray) pada Tikus Putih Jantan	Volume 2/ Nomor 8	Journal Science East Borneo
8.	2015	Uji Toksisitas (<i>Brine Shrimp Lethality Test</i>) dan Aktivitas Anti Hiperurisemia dari Tumbuhan Kaca (<i>Peperomia pellucida</i> L. Khunt) Terhadap Tikus Putih Jantan	Volume 2/ Nomor 8	Journal Science East Borneo
9	2018	Effect of sucrose and plant growth regulators on callogenesis and preliminary secondary metabolic of different explant <i>Myrmecodia tuberosa</i>	Vol. 10, No. 3, pp. 183-192 Agustus 2018	Nusantara Bioscience ISSN: 2087-3948 E-ISSN: 2087-3956

F. Pengalaman Penyampaian Makalah Secara Oral Pada Pertemuan/Seminar Ilmiah Dalam 5 Tahun Terakhir ini

No	Nama Pertemuan Ilmiah/Seminar	Judul Artikel Ilmiah	Waktu dan Tempat
1.	Peranan Farmasi dalam Pembangunan Kesehatan/Seminar	Uji Toleransi Glukosa Ekstrak Etanol Daun Binahong (<i>Anredera Cordifolia</i> [TEN.]	29 September 2012 di Fakultas Farmasi Univ. Sumatera Utara

	Nasional Farmasi 2012	Steenis) Terhadap Kadar Glukosa Darah Mencit	
2.	Peran Riset & Pendidikan Kimia dalam Pembangunan Agro-Industri dan Energi Terbarukan/Seminar Nasional Kimia	Steroid Compound from Root of Cendana Plant (<i>Santalum album</i> Linn.)	20 Oktober 2012 di Gedung Serbaguna Kantor Gubernur Kalimantan Timur

G. Pengalaman Penulisan Buku Dalam 5 Tahun Terakhir

No	Tahun	Judul Buku	Jumlah Halaman	Penerbit
1.	2014	Kimia Triterpenoid	276	Mulawarman Press
-	-	-	-	-
-	-	-	-	-

H. Pengalaman Perolehan HKI Dalam 5 Tahun Terakhir

No	Tahun	Judul/Tema HKI	Jenis	Nomor P/ID
-	-	-	-	-
-	-	-	-	-
-	-	-	-	-

I. Pengalaman Merumuskan Kebijakan Publik/Rekayasa Sosial Lainnya Dalam 5 Tahun Terakhir

No	Tahun	Judul/Tema/Jenis Rekayasa Sosial Lainnya Yang Telah Diterapkan	Tempat Penerapan	Respons Masyarakat
-	-	-	-	-
-	-	-	-	-
-	-	-	-	-

J. Penghargaan Yang Pernah Diraih Dalam 10 Tahun Terakhir (Dari Pemerintah Asosiasi Atau Institusi Lainnya

No	Jenis penghargaan	Institusi pemberi penghargaan	Tahun
1	Satyalancana Karya Sapta X Tahun	Presiden Republik Indonesia	2014
-	-	-	-

Semua data yang saya isikan dan tercantum dalam biodata ini adalah benar dan dapat dipertanggungjawabkan secara hukum. Apabila di kemudian hari ternyata dijumpai ketidaksesuaian dengan kenyataan, saya sanggup menerima sanksi.

Demikian biodata in saya buat dengan sebenarnya untuk memenuhi salah satu persyaratan dalam pengajuan Hibah penelitian dasar unggulan perguruan tinggi.

Samarinda, 14 Desember 2017

Anggota Pengusul II



Dr. Chairul Saleh, M.Si

NIP. 197303312000121001

LAMPIRAN 5. SURAT PERNYATAAN



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS MULAWARMAN
LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT
Alamat: Jl.Krayan No 1 Gedung A 20 Kampus Gn Kelua Samarinda 75119
Telp & Fax (0541) 741033, 748482,e-mail:ippm@unmul.ac.id website:httpwww.ippm.ac.id

SURAT PERNYATAAN KETUA PENELITI/PELAKSANA

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Dr. Yanti Puspita Sari, M.Si.
NIDN : 0004037404
Pangkat / Golongan : Pembina/IVa
Jabatan Fungsional : Lektor Kepala

Dengan ini menyatakan bahwa proposal penelitian saya dengan judul:

POTENSI EKSTRAK KALUS TANAMAN SARANG SEMUT (*Myrmecodia tuberosa* Jack) HASIL *IN VITRO* SEBAGAI ANTIOKSIDAN DAN ANTIMIKROBA

yang diusulkan dalam skema Penelitian Dasar Unggulan Perguruan Tinggi untuk tahun anggaran 2017-2018 **bersifat original dan belum pernah dibiayai oleh lembaga/sumber dana lain.**

Bilamana di kemudian hari ditemukan ketidaksesuaian dengan pernyataan ini, maka saya bersedia dituntut dan diproses sesuai dengan ketentuan yang berlaku dan mengembalikan seluruh biaya penelitian yang sudah diterima ke kas negara.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan sesungguhnya dan dengan sebenar-benarnya.

Samarinda, 14 Desember 2017

Yang menyatakan,

Mengetahui
Ketua IPPM,

(Prof. Dr. Susilo, M.Pd)
NIP.197112052002121002


Yanti Puspita Sari, M.Si)
NIP. 19681225 199403 1 001

LAMPIRAN 6. SERTIFIKAT NASIONAL

Sertifikat
Nomor : 201/A2/10/Paspa1_ExpO/2018
Diberikan Kepada
Dr. YANTI PUSPITA SARI, M.Si
Sebagai
PEMAKALAH
Third Postgraduate Bio Expo
"SEMINAR NASIONAL IV BIOLOGI DAN PEMBELAJARANNYA"
yang diselenggarakan oleh Prodi Pendidikan Biologi S2 Pascasarjana Universitas Negeri Medan
Pada tanggal 12 Oktober 2018

DIREKTUR
Program Pascasarjana
Universitas Negeri Medan
Prof. Dr. Borjok Sinaga, M.Pd.
NIP: 195509161991021001

KETUA PRODI
Pendidikan Biologi Pz
Universitas Negeri Medan
Dr. Fauziyah Harahap, M.Si
NIP: 196607281991032002

Ketua Penyelenggara
Bioexpo 2018
Corry Sepvia Br-Pasanibu, S.Pd.

Logo: RISTEKDIKTI, Universitas Padjadjaran, Universitas Negeri Medan, and other educational institutions.

LAMPIRAN 7. SERTIFIKAT INTERNASIONAL



Effect of sucrose and plant growth regulators on callogenesis and preliminary secondary metabolic of different explant *Myrmecodia tuberosa*

YANTI PUSPITA SARI^{1,*}, EKO KUSUMAWATI¹, CHAIRUL SALEH², WAWAN KUSTIAWAN³,
SUKARTINGSIH³

¹Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Mulawarman University. Jl. Barong Tongkok No. 4, Kampus Gn. Kelua, Samarinda, 75119, Kalimantan Timur, Indonesia. Tel.: +62-541 747974, Fax: +62-541-747974, *email: ypsman2002@yahoo.com

²Department of Chemistry, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Mulawarman University. Jl. Barong Tongkok No. 4, Kampus Gn. Kelua, Samarinda, 75119, Kalimantan Timur, Indonesia

³Faculty of Forestry, Mulawarman University. Samarinda 75119, East Kalimantan, Indonesia

Manuscript received: 24 July 2018. Revision accepted: 24 August 2018.

Abstract. Sari YP, Kusumawati E, Saleh C, Kustiawan W, Sukartingsih. 2018. Effect of sucrose on callogenesis and preliminary secondary metabolic of different explant (*Myrmecodia tuberosa*). *Nusantara Bioscience* 10: 183-192. *Myrmecodia tuberosa* Jack is a medicinal plant that contains bioactive compounds, such as flavonoids, tannins, tocopherols, phenols, and an abundance of minerals, that are useful as antioxidants. With the constant increases in popularity of the medicinal plant, the *M. tuberosa* is threatened by extinction if over-exploitation continues. Thus, the effort to conserve this plant is vital. Tissue culture is an alternative method to conserve and produce active compounds that are similar to those of the native ant nest plant with callus. The addition of certain compounds such as sucrose can affect the secondary metabolite content through in vitro plant or callus. The aim of this research was to find the explant sources (cotyledon, stem, tuber, and root), determine the best growth regulator to produce the callus, and evaluate the optimum sucrose concentration to enhance secondary metabolite production of the callus. The results showed that callus was obtained from all explant sources and all growth regulators. The best callus that was marked by a friable green and yellowish green callus was provided by cotyledon with the growth regulator of 2 mg·L⁻¹ of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 2 mg·L⁻¹ of kinetin. Calli treated with 30 g of sucrose resulted in the best secondary metabolites, containing alkaloids, phenols, flavonoids, saponins, and steroids.

Keywords: 2,4-D, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, callus, *Myrmecodia tuberosa*, kinetin, secondary metabolite, sucrose

INTRODUCTION

The ant nest plant (*Myrmecodia tuberosa*) is a herbal medicine that contains bioactive compounds, such as glycosides, vitamins, minerals, flavonoids, tocopherols, polyphenols, and tannins (Engida et al. 2013; Sanjaya et al. 2014; Sudiono et al. 2015), which are useful as antioxidants and anticancer compounds. Several researchers have shown that the ant nest plant inhibits the growth of various types of cancer cells, such as those in ovarian cancer (Hasanuddin et al. 2015), oral tongue squamous cell carcinoma (OTSCC) (Supriatno 2014), lung and colon cancer (Manoi 2008; Subroto and Saputro 2008), HeLa and MCM-B2 cell cancer (Soeksmanto et al. 2010). Another report showed that the ant nest plant has anti-microbial bioactivity and antioxidants (Prachayasittikul et al. 2008).

The popularity of the ant nest plant as a pharmaceutical plant is undoubtedly, causing many people to explore directly from nature. The over exploration of the *Myrmecodia* plant without cultivation might decrease the population. Thus, there is an urgent need to restore the natural population of this plant and use an alternative pharmaceutical source without taking it directly from nature. The tissue culture method is an alternative to

provide raw material to produce a medicinal compound to achieve great benefits in the pharmaceutical aspect (Radha et al. 2011) and to select genotypes that have considerable amounts of bioactive compound (Cantelmo et al. 2013). Generally, organ culture, cell suspension, and callus culture have been used to study secondary metabolite synthesis using the tissue culture method (George and Sherrington 1984; Smetanska 2008). Massive development through tissue culture indicates that it does not affect the active compound content from the plants.

To assess biomass accumulation and synthesis of secondary compounds in cultures, various strategies have been developed. Biomass accumulation and metabolite biosynthesis are two-stage events. The first stage is to control the parameters, including regulation the growth and multiplication of both cultured cells/organs and biomass accumulation, as well as parameters that related to biosynthesis of metabolites which are controlled in the next step. Further, to select high-producing cells or organ clones; optimize medium parameters such as suitable medium, salt, sugar, nitrogen, phosphate, and plant growth regulator levels; and physical factors such as temperature, illumination, light quality, medium pH, agitation, aeration, and environmental gas (e.g., oxygen, carbon dioxide, and ethylene) can be controlled in the

early stage of the culture process. Meanwhile, in the second stage of the culture process, elicitation, replenishment of nutrient and precursor feeding, permeabilization, and immobilization strategies that assist with the accumulation of metabolites can be applied. In addition, in line with stage-specific strategies, to produce huge number of biomass in accordance with an increase in the accumulation of secondary compounds can be also possible (Murthy et al. 2014).

The successful tissue culture depends on factors such as the medium, growth regulator, explant source, and environment. In addition, the successful tissue culture has been also affected by the types and concentration of the growth regulator added in the medium (Shi 2014). Auxin, cytokinin, and gibberellin are growth regulators usually used in tissue culture (Davies 2010; Coggins and Lovatt 2014; Erland et al. 2017). One of the auxins, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) which is a synthetic growth regulator, is beneficial to induce callus formation (Welsh and Mogeia 1991; Phua et al. 2016). Nevertheless, proper interaction between auxin and cytokinin should be considered to enhance callus growth.

Past researchers have stated that the highest weight of callus was obtained from 1.00 mg·L⁻¹ of BA in combination with 0.99 mg·L⁻¹ of 2,4-D in *Solanum khasianum* (Tambe 2013) and 3.0 mg·L⁻¹ of 2,4-D in *Gardenia latifolia* (Reddy and Saritha 2012). Meanwhile, Sari and Kusuma (2015) revealed that an ant nest plant callus was formed in solid and liquid Murashige and Skoog (MS) medium with 2,4-D (2 mg·L⁻¹) and kinetin (2 mg·L⁻¹). In addition, a high quality of callus can be produced using specific nutrients and manipulate nutrient components in the culture medium (e.g., carbon source, nitrogen, and phosphate) to induce cell growth for effectiveness of secondary metabolite production (Tapia et al. 2001).

Sucrose has a positive effect on the production of secondary metabolites both in cell and organ cultures (Paiva and Janick 1982; Fowler 1983). The effect of sucrose concentration (i.e. 20, 30, 40 and 60 g L⁻¹) was investigated in suspension cultures of *Panax notoginseng* for production of ginseng saponin (secondary metabolite) and polysaccharide (primary metabolite). In addition, a sugar feeding strategy was formulated to enhance the saponin accumulation by *P. notoginseng* cells (Zhang et al. 1996). Sucrose concentration (5, 7, and 9% w/v) showed increased accumulation of phenols, flavonoids, chlorogenic acid, and total hypericin in adventitious root cultures of *Hypericum perforatum* L (Cui et al. 2010). Sucrose levels below 6-9% did not significantly alter the specific alkaloid content, but biomass production by *Solanum aviculare* hairy roots was maximum and about 60% higher than in 3% sucrose medium when the initial sucrose concentration was 4-6% (Yu et al. 1996). The suitable medium for both biomass Brahmi (*Bacopa monnieri*) (6.31 ± 0.12 g fresh weight and 250 ± 5.00 mg dry weight) and bacoside A accumulation (13.09 mg g⁻¹ dry wt) found in MS medium supplemented with 2% sucrose and pH set at 4.5 (Naik et al. 2010).

Based on the information above, the purpose of this research was to determine the optimum combination of growth regulators (2,4-D: 0.5, 1, 1.5, and 2 mg·L⁻¹ and kinetin 2 mg·L⁻¹) and explant source (cotyledon, stem, tuber, and root) on callus production in the ant nest plant using an in vitro method. The research was also aimed to evaluate the optimum sucrose concentration to enhance secondary metabolite production from the callus.

MATERIALS AND METHODS

Plant materials

Seeds of the ant nest plant (*Myrmecodia tuberosa* L. family Rubiaceae) were provided from the ripe fruit, which were collected from Antutan village, Tanjung Palas regency, Bulungan district, North Borneo. The seeds collection has been granted and permitted by the head of local authority (reference 025/RT-004/ATT/XI/2017)

Sample preparation

Seeds were sterilized using 70% alcohol for 1 minute, followed by 30%, 20%, and 10% sodium hypochlorite (v/v) for 10 minutes each and washed three times for 5 minutes in sterile conditions. For germination, seeds were placed in MS medium and agar (7.5 g L⁻¹) with 30 g L⁻¹ sucrose (Murashige and Skoog 1962).

Seed germination

Sterile seeds of the ant nest plant were grown in glass bottles, containing MS0 (basal medium without plant growth regulators), incubated in a culture room with a light intensity of ±1000-2000 Lux with a temperature of 20°C-25°C. After one month, the seedling plant was used as an explant source, which was grown in a callus formation medium. The cotyledon, hypocotyl, tuber, and root were used as explant sources.

Callus formation

Cotyledon from a month-old plant was prepared to use as an explant source. The explant was grown in MS with a growth regulator combination of 2,4-D (0.5, 1, 1.5, and 2 mg·L⁻¹) and kinetin (2 mg·L⁻¹), incubated in a tissue culture room with a light intensity of ±1000-2000 lux with a temperature of 20°C-25°C for 10 weeks. All growth regulation concentration was selected as described in previous experiment (Sari and Kusuma 2015). All treatment was done in triplicates.

Sucrose treatment

The best callus from induction was used in sucrose treatment. The 0.5 g callus was weighed and placed in the MS medium that was added with different concentrations of sucrose (30, 60, 90, and 120 g). After 8 weeks, secondary metabolite content was determined from each callus.

Secondary metabolite extraction

The callus was extracted using ethanol as a solvent for 48 h. The extraction process continued until the extraction solution become clear (\pm 48 h) followed by filtration using Whatman paper (Whatman 2; Sigma-Aldrich, Germany). After filtration, a rotary evaporator was used to evaporate the remaining solvent. The extracted ethanol was then collected to be used as a sample extract in the phytochemical test to determine the phytochemical contents in the ant nest plant extract.

Phytochemical test

To detect the presence of possible phytochemicals in the sample extract, some phytochemicals, such as alkaloids, flavonoids, phenols, saponins, and steroids/triterpenoids, were tested, following the methods of Pal et al. (2012). For the alkaloid test (Mayer's test), 1 mL of Wagner's reagent was added to the extracted sample. The formation of a white precipitate indicates a positive test. In the flavonoid test (Shinoda's test), 5 mL of extract and 1 mL of concentrated hydrochloric acid and magnesium ribbon were mixed and shaken. The appearance of a pink-red color indicates the presence of flavonoids. For the phenolic test, the extracted sample was mixed with a few drops of 1% solution of FeCl_3 . A blue-green or black coloration indicates the presence of phenol. In the saponin test (foam test), the extracted sample was added to 10 mL of distilled water, cooled, air dried, and shaken vigorously for 10 s. The appearance of stable foam (1-3 height) indicates the presence of saponin. In the steroid/triterpenoid test (Liebermann-Burchard test), CH_3COOH glacial and absolute H_2SO_4 were added to the sample extract with a ratio of 20:1. The appearance of a blue or green color indicates the presence of steroids, and the appearance of a red or brown color indicates the presence of triterpenoids.

Data analysis

The results were presented as descriptive data. Callus induction was observed at the first growth of the callus along with the percentage of callus growth, callus morphology (texture and color), and callus growth

intensity. For the phytochemical test, the presence or absence of phytochemicals such as alkaloids, flavonoids, phenols, saponins, triterpenoids, and steroids in the extract was indicated as positive (presence) or negative (absence). Weight of callus which were obtained after various concentration of sucrose treatment were analysed by using ANOVA (SPSS 22, Inc., USA), followed by Tukey's post hoc test to evaluate any significant differences at $p < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

Seed germination

The seeds of the ant nest plant that were grown in MS0 started to grow on day 3, reaching full growth as a plant at day 30 (Figure 1).

Seed germination is a mechanism related to the alteration of both morphological and physiological aspects, which is caused by embryo activation. The process of embryo expansion and elongation is a process that is initiated by absorbing water by the seed before germination. The germination process is terminated when the radicle has completely grown out to cover the seed layers (Hermann et al. 2007).

Seed germination of the ant nest plant using tissue culture was affected by two types of factors: internal and external factors. The internal factors include the endosperm (food stores) and the level of seed maturity. In agreement with the findings by Miransari and Smith (2009), for the seed to germinate, the availability of starches, proteins, lipids, and nutrients must be completed in the seed embryo through the activity of specific enzymes and pathways. Müller et al. (2013) added that the activity of the enzyme pectin methylesterases is also influenced in seed germination. Further, the homogalacturonans of the wall, a methyl esterified, are facilitated by the enzyme that affects the cell-wall porosity and elasticity, causing cell growth and water uptake. In addition, the expansion of the cell wall of the radicle and the tissues occurs during the process of seed germination.

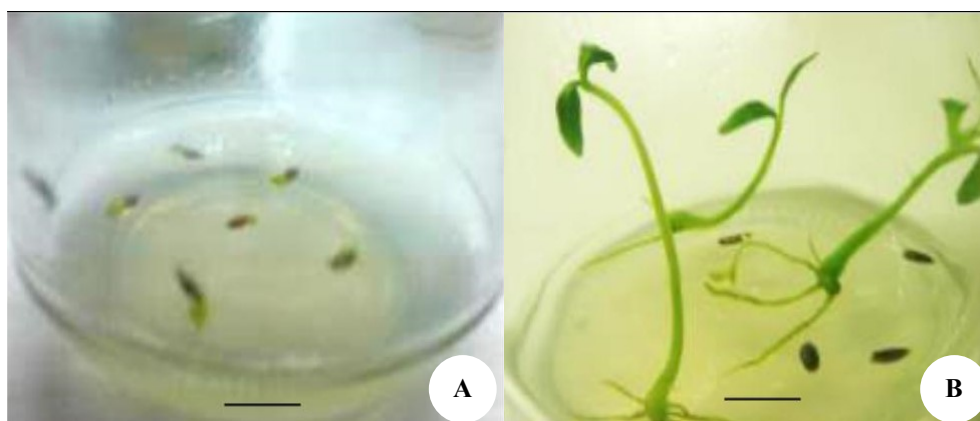


Figure 1. Seed germination of the ant nest plant (*Myrmecodia tuberosa*) in MS0 medium. A. 3 days, B. 30 days. Bar = 1 cm

Besides internal factors, seed germination is also affected by external factors, such as plant growth regulators, light, and medium composition. The successful seed germination of the ant nest plant in a brief time is influenced by the MS medium composition, which contains several amino acids that might boost seed germination. Waes and Debergh (1986) reported that the addition of amino acids, such as serine, glutamic acid, peptone, hydrolysate casein, and yeast extract, in the medium induce seed germination. In comparison with other salt formation, MS inorganic salts have high contents of nitrate, potassium, and ammonium. The MS medium also contains high macro and microelements and inorganic salts that are sufficient to support the optimum growth of the plant. In addition, the concentration and quality of nitrogen in the MS medium contribute to the prolific growth obtained with plant-derived seed types that are incubated in this medium. Thus, the nitrogen supplied in the medium is in inorganic form as

the anion NO_3 or the cation NH_4 . According to Malmgren (1996), the ammoniated form of nitrogen is more beneficial than the nitrate form, which is proved by the fastest growth of the *Dactylorhiza* species seedlings at $50\text{-}100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NH_4NO_3 . Similar results were found in past research, which revealed that an efficient concentration of organic and inorganic nitrogen sources can be used to promote the growth of explants (Chen and Chang 2002). The 30-day old ant nest plant was used as an explant source to be grown in the initial medium treatment.

Callus induction

Callus induction of cotyledon, stem, tuber, and root explants of the ant nest plant was affected by the combination of growth regulators 2.4-D and kinetin (Table 1).

Table 1. Effects of 2.4-D and kinetin composition on the callus induction of the ant nest plant (*Myrmecodia tuberosa* Jack) from the cotyledon, stem, tuber, and root explants at week 10

Explant	Growth regulator		Percentage of callus formation (%)	Callus formation time (week)	Callus morphology		Callus intensity
	2.4-D $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	Kinetin $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$			Color	Texture	
Cotyledon	0.5	0.0	100	2	Yellow	Friable	++
	1.0	0.0	100	2	Yellow	Friable	++
	1.5	0.0	100	2	Yellowish green	Friable	++
	2.0	0.0	100	2	yellowish green	Friable	++
	0.5	2.0	100	2	Yellowish green	Friable	+++
	1.0	2.0	100	2	Yellowish green	Friable	+++
	1.5	2.0	100	2	Yellowish green	Friable	+++
	2.0	2.0	100	2	Green-yellowish green	Friable	+++
Stem	0.5	0.0	100	2	Yellowish green	Friable	++
	1.0	0.0	100	2	Yellow	Friable	++
	1.5	0.0	100	2	Yellowish green	Friable	++
	2.0	0.0	100	2	Yellow	Friable	++
	0.5	2.0	100	2	Yellow	Friable	+++
	1.0	2.0	100	2	Yellowish green	Friable	+++
	1.5	2.0	100	2	Yellowish green	Friable	+++
	2.0	2.0	100	2	Yellowish green	Friable	+++
Tuber	0.5	0.0	100	2	Yellowish green	Friable	++
	1.0	0.0	100	2	Yellowish green	Friable	++
	1.5	0.0	100	2	Yellowish green	Friable	++
	2.0	0.0	100	2	Yellow	Friable	++
	0.5	2.0	100	2	Yellowish green	Friable	+++
	1.0	2.0	100	2	Yellow	Friable	+++
	1.5	2.0	100	2	Yellow	Friable	+++
	2.0	2.0	100	2	Yellowish green	Friable	+++
Root	0.5	0.0	100	2	Yellowish green	Friable	+
	1.0	0.0	100	2	Yellowish green	Friable	+
	1.5	0.0	100	2	Yellowish green	Friable	++
	2.0	0.0	100	2	Yellowish green	Friable	++
	0.5	2.0	100	2	Yellowish green	Friable	+++
	1.0	2.0	100	2	Yellowish green	Friable	+++
	1.5	2.0	100	2	Yellowish green	Friable	+++
	2.0	2.0	100	2	Yellowish green	Friable	+++

Note: + = low, ++ = intermediate, +++ = high. Three explants were used for each PGRs combination

All treatment combinations of growth regulators resulted in calli with a percentage of 100%. A callus is a collective form of disorganised cell masses. The formation of callus via growth and accumulation of cells has a relationship with wounding. Further, a single differentiated cell and other totipotent cells could produce a callus that can regenerate the whole plant body (Nagata and Takebe 1971). The callus is formed at 2 weeks of age, marked by explant swelling and callus formation in the edge, slice, or lesion of the explant. The callus is fully formed at the leaf surface after a month. This is related to the uptake of nutrition in the medium by the explant. The absorption of nutrients is even better with direct contact between the medium and explant.

This result was in line with previous research performed by Morini et al. (2000), which revealed that the callus formation of quince leaves was found only in the abaxial surface part. The appearance of the callus on the injured part might be because of the excitement of the tissue on the explant to cover the wound. Explant response on the treatment medium is started with explant swelling or elongation. The size of the explant becomes bigger from the beginning, and the callus begins to form on part of the injured explant. The combination of auxin (2,4-D) and cytokinin (kinetin) as growth regulators on the MS medium can induce callus formation, both in single and combination treatments. The callus began to appear on the edge of the explants and on the wounded parts and continued to grow until the end of the observation at 10 weeks after planting. In addition, Stobbe et al. (2002) revealed that the wound-induced calli regenerate new organs or new tissues, suggesting that they are highly pluripotent.

In 2,4-D without kinetin, callus growth response in all explants (cotyledon, stem, tuber, and root) with a small callus needed extended time to grow bigger. This suggests that the ant nest plant callus cannot grow optimally with a single auxin administration without the addition of a growth regulator from the cytokine group. According to Kala et al. (2014), the growth regulators cannot induce a callus from *C. parviflorum* leaf explants. However, the combinations of growth regulators resulted in optimum callus production. Callus formation is strongly influenced by the type and concentration of the growth regulator. Zulfiqar et al. (2009) revealed that the growth and morphogenesis of plants in vitro are controlled by the balance and interaction of the growth regulator that was absorbed from the media. Auxins play a role in stimulating the growth of explant cells; thus, auxin tends to form a callus that begins from cell division in the meristematic area. At the beginning of the growth response, auxin triggered the elongation of cells through loosening the cellulosic cell wall. This elongation of the cell was due to the response of 2,4-D, but the cell cannot divide rapidly because there was no addition of kinetin. The combination of the growth regulators, 2,4-D, and kinetin, in all explant sources (cotyledons, stems, tubers, and roots) resulted in a larger callus size compared to only 2,4-D. In line with past research (Rout et al. 2000), the combination of 2,4-D and

kinetin resulted in the largest callus of *Cephaelis ipecacuanha* and *Melaleuca alternifolia* (Kiong et al. 2007). Stella and Braga (2002) used a combination of auxin (picloram) and cytokinin (kinetin) in the callus of *Rudgea jasminoides*. The best callus was found through the addition of $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ of 2,4-D and $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ of kinetin in all explants that were used. In addition to the larger callus size, the resulting callus had a more intensive green color with friable callus texture. The large callus size might be due to the corresponding concentration of growth regulators, causing rapid cell division in the ant nest explants. The callus can be provided with two plant hormones, auxin, and cytokinin in a balanced condition. Pande et al. (2015) also got highest callus induction frequency on MS media supplemented with 1.5 mg L^{-1} 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid, and 1.5 mg L^{-1} of Benzyl amino purine.

Callus color

The results of the observation for 10 weeks after planting found that the combination of growth regulator 2,4-D and kinetin on the MS medium induced the formation of a callus on various explants from the ant nest plants (Figure 2). The color of the calli at all treatments ranged from yellow and yellowish green to green. The resulting color variations might be due to the diverse types of growth regulators, the difference in growth regulator concentration, and the type of explant. Compared to only auxin, a combination of auxin and cytokinin resulted in a callus color that was more green, caused by cytokinin, which tends to promote chlorophyll formation (Edwin F George et al. 2008). According to Afshari et al. (2011), various callus color conditions could be caused by the pigmentation, the influence of light, and the plant parts used as the source explant.

Based on the callus color (Figure 2), the addition of $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ of 2,4-D and $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ of kinetin resulted in assorted colors from pale green and yellowish green to green. The green color of the callus of the ant nest plant was because of the chlorophyll content. The chlorophyll was formed in the callus due to the addition of the growth regulator 2,4-D and kinetin. Kinetin from the cytokinin group is involved in the chlorophyll formation in the callus along with the existence of light. This finding was in line with previous research by Leupin et al. (2000), which reported that the color change in callus to green was because of chlorophyll formation.

Meanwhile, the yellow to yellowish green callus (Table 1) was found because of the kinetin concentrations added to the media, which had a lower concentration than 2,4-D. Kinetin as a cytokinin stimulated chlorophyll formation, whereas auxin can be an inhibitor. According to George and Sherrington (1984), the decrease in the formation of chlorophyll with 2,4-D was found in the culture of peas and potatoes. In addition, the yellow color callus was also caused by the chlorophyll degradation process, lack of kinetin, and low kinetin concentration. In addition, kinetin plays a role in the formation of chlorophyll, causing the green color to appear.

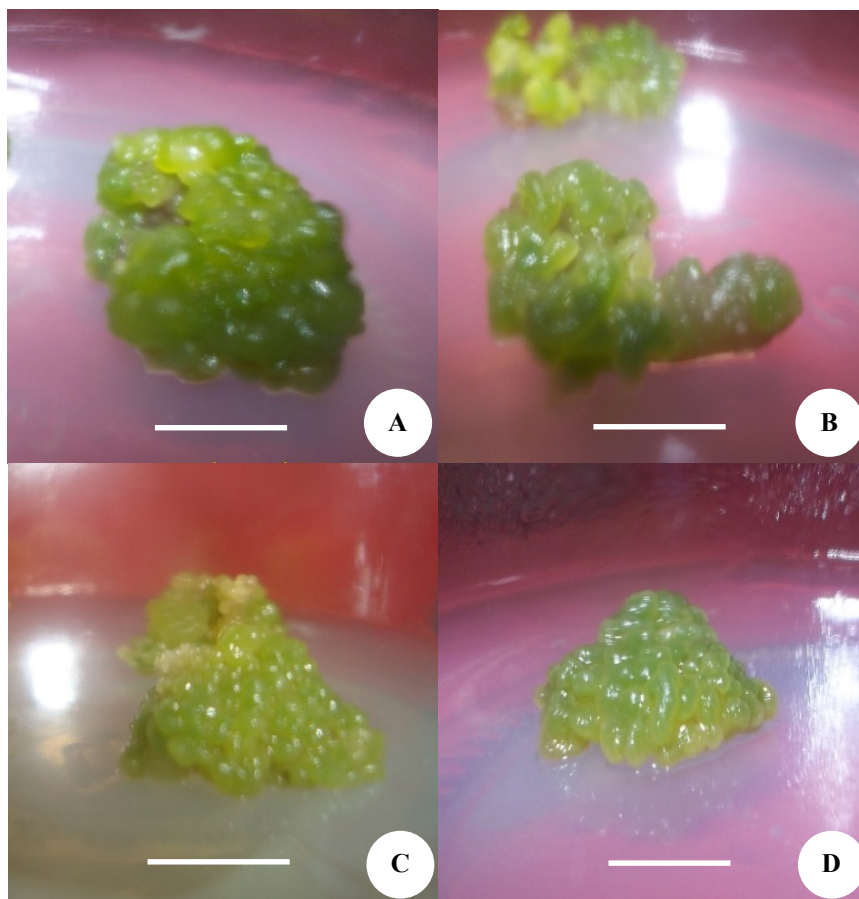


Figure 2. Optimum calli at a concentration of $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ of 2,4-D and $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ of kinetin at 10 weeks after planting in explant. A. Cotyledon, B. Stem, C. Tuber, D. Root. Bar = 1 cm

Callus texture

Table 1 shows friable callus was found in calli with all treatments. The friable callus was formed through the growth of cells at a small size and loose cell interaction that was affected by the occurrence of auxin. Previous researchers reported that 2,4-D stimulated cell elongation by increasing of plasticity of the cell wall to become loose, causing water to easily flow to the inner cell by osmosis, causing the cell to become elongated (Robbiani et al. 2010). Thus, friable calli contain much water because the wall cell has not reached lignification yet, and the group of cells can be easily separated from the others. The callus texture from the explant can be distinguished as friable and non-friable. The non-friable callus has compact and tight cells that are difficult to separate. In contrast, a friable callus from an explant has loose cell interaction that is easily detached using tweezers.

The addition of growth regulator with a combination of 2,4-D and kinetin on various explants formed a friable texture in the callus (Figure 2). The friable callus was also obtained in a study conducted by Sari and Kusuma (2015), which reported that the friable callus was also obtained on ant nest cotyledons planted in solid and liquid MS media.

In line with Chakraborty et al. (2013), the MS medium with 2,4-D ($0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) and kinetin ($0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) resulted in the best explant *Withania somnifera* (L.) for callusing with soft, friable, and greenish white features. The addition of growth regulators in the medium caused the callus cells to be active in cell division and cell enlargement, raised the osmotic pressure, and increased protein synthesis.

The current visual results indicated that the appearance of the callus with only the 2,4-D and with the 2,4-D and kinetin combination produced a friable callus and formed nodules (globular). This indicated that the callus can be further grown into shoots or plantlets. Purnamaningsih (2016) stated that the callus structure usually describes regeneration potency to form buds and roots. The friable callus has a higher ability to form buds than the compact callus. In this case, the growth regulator increased callus regeneration. In addition, the growth of the callus was also greatly affected by the nutrient balance.

Sucrose treatment

The weight gain of the callus was significantly affected by different concentrations of sucrose. The average weight gain of the callus is shown in Table 2.

Table 2. Callus morphology and average of weights of the callus of the ant nest plant (*Myrmecodia tuberosa*) treated with different concentrations of sucrose for 8 weeks

Sucrose (g)	Callus morphology		Mean weight of callus (g)
	Color	Texture	
30	Green	Friable	2.12 ± 0.40 ^d
60	Green-yellowish green	Friable	1.60 ± 0.18 ^c
90	Yellowish green	Friable	1.15 ± 0.28 ^b
120	Yellowish green	Friable	0.68 ± 0.69 ^a

Note: Different letters (a, b, c) indicate significantly different means for different treatments at $p < 0.05$ using Tukey's test

Callus morphology

Callogenesis is the initial response, characterized by the formation of the callus, which starts from the edge of the explant (wounded part) at the top and bottom that has direct contact with the medium. The callus is formed faster on the part that has direct contact with the media. This is probably related to the process of nutrient uptake in the medium by the explant. The appearance of the callus on the wounded part might be caused by the excitement of the tissue on the explant to cover the wound. George and Sherrington (1984) stated that the cell division that leads to the callus formation occurs from the injuries and both the natural and artificial hormone supply from the outside into the explant.

Light is an external factor that influences callus formation. The color change that exists in the callus was because of pigment, nutrients, and environmental factors, such as light (Evans et al. 2003). George and Sherrington (1984) stated that white light could induce callus formation and organogenesis in the plant tissue. A callus that has yellowish green and green color was formed with the addition of kinetin. The green color was because of chlorophyll, resulting from the 2.4 D interaction with kinetin, mainly because kinetin (cytokinin) has a function in the formation of chlorophyll in the callus and due to environmental factors, such as exposure to light. Leupin et al. (2000) claimed that the color change in the callus from white to green was due to chlorophyll formation.

Callus growth

The largest mean (2.12 g) of callus weight of the ant nest plant was found in sucrose-treated medium at 30 g L⁻¹ (Table 2). However, the sucrose-treated medium leads to reduced callus weight. In the treatment of 60 g L⁻¹, sucrose decreased the weight of the callus to 1.60 g. This was due to the increasing concentration of medium that inhibited the absorption of water and minerals. These inhibitory effects were found in the 90 and 120 g L⁻¹ sucrose-treated medium, resulting in a mean weight of callus of 1.15 and 0.68 g. Based on the current results, it can be estimated that the sucrose-treated medium above 30 g L⁻¹ can inhibit the growth of the *M. tuberosa* callus. Lindsey and Yeoman (1983) stated that the inhibition of growth in cultures that

produced secondary metabolites is probably due to a competition between primary metabolism and secondary metabolism for the same substance. The *M. tuberosa* plant is a medicinal plant for which the callus formation in the tissue culture also has the same secondary metabolite content with the original plant in nature.

The current results found that the callus color ranged from green to yellowish green. The callus color indicates the presence of chlorophyll in the tissues. The green callus was present in MS-treated medium with a sucrose concentration of 30 and 60 g L⁻¹. The greener color callus indicates more chlorophyll content, which can support the growth of the callus. The yellowish green callus was also found in the sucrose treatment with different concentrations: 90 and 120 g L⁻¹. The resulting color variation was caused by the difference in sucrose concentration in each treatment. This finding is in agreement with that of George and Sherrington (1984) in which sucrose in the tissue culture media can inhibit chlorophyll synthesis with varying levels of inhibition, depending on the tissue and plant species. The accumulation of sucrose in cells can also inhibit the process of photosynthesis because of the accumulation of sucrose in the cell, causing the demand of sugar in the cell to be fulfilled. As a result, the cells inhibit photosynthesis and the formation of chlorophyll.

Growth in tissue culture can be characterized by the increase of the wet weight of the callus. Physiologically, the weight of the wet callus consists of water and carbohydrates that have a relationship with sucrose in the culture medium as a carbon source and osmotic regulator, which is critical for embryoid and callus formation (Last and Brettell 1990). Sucrose can be rapidly hydrolyzed to form glucose and fructose, increasing the osmolality of the medium. In this study, the sucrose-treated medium entered the plant cell through diffusion and osmosis processes. Shahnewaz and Bari (2004) revealed that the effect of sucrose concentration influences the callus induction frequency that might be due to its contribution to the osmotic potential of the medium instead of its utilization as a carbon source.

In cell metabolism, glucose and fructose enter into the glycolysis and Krebs cycle to form ATP to be used for callus growth. Perry et al. (1987) revealed the change in solute content (e.g. carbon source) could cause various change in turgor and osmotic turgor. In tissue culture, turgor pressure might cause elongation and magnification of callus cells. Furthermore, turgor pressure might be different in each cell, and the cell growth response to the addition of carbohydrates also varies for each species.

Phytochemical test

The phytochemical test results of the callus of the ant nest plant with different concentrations of sucrose are shown in Table 3.

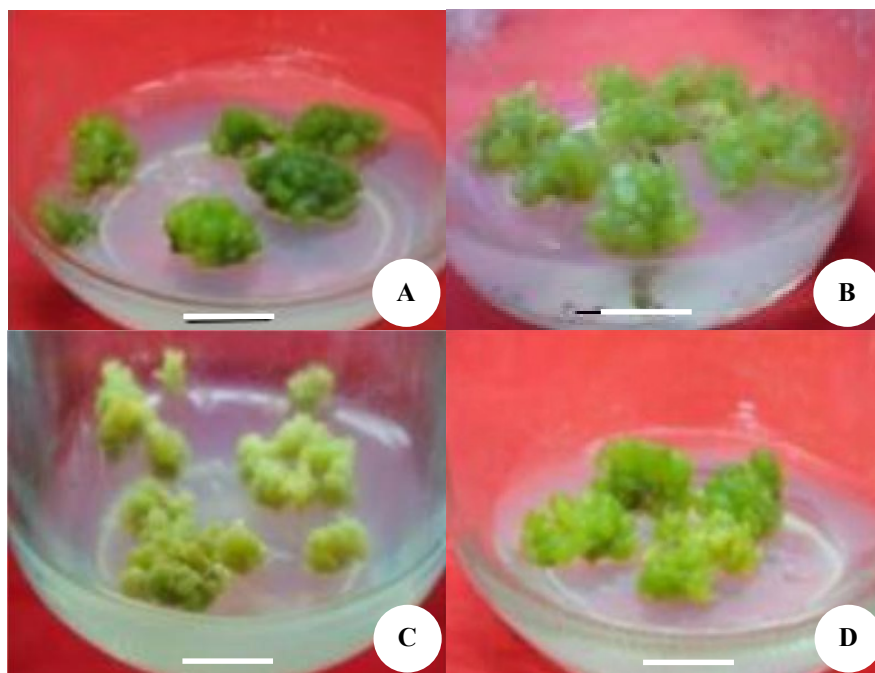


Figure 3. Callus of the ant nest plant (*Myrmecodia tuberosa*) with different concentrations of sucrose. A. 30 g·L⁻¹, B. 60 g·L⁻¹, C. 90 g·L⁻¹, D. 120 g·L⁻¹ for 8 weeks. Bar = 1 cm

Table 3. Phytochemical screening test of the ant nest plant callus with different sucrose concentrations

Sucrose (g)	Flavonoid	Phenol	Alkaloid	Saponin	Steroid	Triterpenoid
30	++	++	++	++	++	-
60	+	+	+	+	+	-
90	+	+	+	+	+	-
120	+	+	+	+	+	-

The phytochemical test on the ant nest plant calli treated with different sucrose concentrations found that metabolite content was positive from each treatment, which contained flavonoids, phenols, alkaloids, and steroids, whereas a negative result was found for triterpenoid. The best sucrose treatment was obtained with the addition of 30 g, resulting in a more concentrated test color than the others. There was no change in metabolite content between the ant nest plant callus from the tissue culture and from nature. Sari et al. (2017) stated that all parts of the ant nest plant (tuber, stem, and leaves) from nature contained phenols, flavonoids, saponins, and alkaloids but not triterpenoid. According to Fowler (1983), the tissue culture method can be used to produce chemical compounds that are usually derived from the native plant as well as new compounds synthesis, which is not produced by the plant. The secondary metabolites synthesized from the explant with the tissue culture depend on the culture condition. The proper culture produces secondary metabolites that are similar to those of the native plant. Based on the utilization aspect, ant nest plants have various chemical compounds. The chemical compounds from this plant might have a role in the activity of pathogenic resistance, allelopathy, and

body defense against pest attacks. The compounds are utilized by the plants as a self-defense system, while for humans, they are used as an active ingredient in medicine. According to Subroto and Saputro (2008), ant nest plants are rich in tocopherol antioxidants (vitamin E) and some important minerals (calcium) for the body.

Koes et al. (2005) stated that flavonoids can be synthesized in all parts of the plant that have a pivotal role in providing color, fragrance, and taste to the fruits, flowers, and seeds, which makes them attractants for insects, birds, or mammals and aids in pollen or seed transmission. In addition, Blount et al. (1992) stated that flavonoids that are very important in plant resistance against pathogenic bacteria and fungi also have antipathogenic properties that can be non-specific and result, in part, from their antioxidative properties. Moreover, Beckman (2000) added that flavonoids affect the tightening of the plant structures and tissues by stimulating auxin (IAA) activity, which promotes the differentiation of tissues and promotes of callus and tylose formation and the closure of the vascular system to protect against pathogen infection.

Subroto and Saputro (2008) claimed that the function of flavonoids as an antiviral, including for the HIV virus (AIDS) and herpes virus, has been widely published. Moreover, flavonoids are also reported to play a pivotal role in the prevention and treatment of several diseases, such as cancer, asthma, cataracts, diabetes, gout, rheumatism, haemorrhoids, and periodontitis (inflammation of the connective tissue of the tooth root), protecting the cell structure, having a synergistic relationship with vitamin C, and are anti-inflammatory and prevent bone loss.

Flavonoids and phenolic acids are major groups of secondary metabolites and bioactive compounds in plants (Kim et al. 2003). Both have a function as reducing agents, free radical scavengers, and quenchers of singlet oxygen formation. In addition, flavonoids and phenolic acid components play important roles in the control of cancer and other human diseases (Ghasemzadeh and Ghasemzadeh 2011). Meanwhile, phenolic compounds that are important for plant growth and reproduction are formed as a response to environmental factors, for example, light and chilling, pollution, etc.) and to defend wounded plants (Kefeli et al. 2003).

Besides flavonoids and phenols, alkaloids have certain pharmacological activity. Some of them are toxic to humans, but many also can be used in the medicinal field, such as to raise blood pressure, reduce pain, and fight microbial infections. In addition, alkaloids for plants, among others, function as toxic substances to fight insects or plant-eating animals (Subroto and Saputro 2008).

Another secondary metabolite, namely, saponin, a glycoside of triterpenes and steroids, is important for pharmaceuticals. Moreover, the underexplored biodiversity of plant saponins is likely to prove to be a vital resource for future drug discovery. Saponin is also one of the most numerous and diverse groups of natural plant products that serve a range of ecological roles, including plant defense mechanisms against disease and herbivores and possibly as allelopathy agents in competitive interactions between plants (Makkar et al. 2007).

In summary, this study indicates that $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ of 2.4-D and $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ of kinetin can potentially be used to obtain the best callus from the cotyledon explant source. The study has also shown that alkaloid, flavonoid, phenol, saponin, and steroid are found in the secondary metabolites of the ant nest plant callus. Further research needs to be conducted to examine antioxidant profiles, antimicrobial properties and toxicity level of ant nest plant callus extract.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the Indonesian Government through the Ministry of Research and Technology, General Higher Education (Kemenristek DIKTI), Indonesia (Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi/PUPT) contract number 359/un17.41/kl/2017 for financial support.

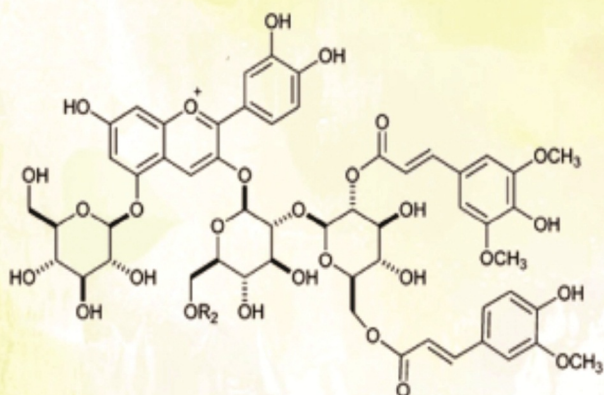
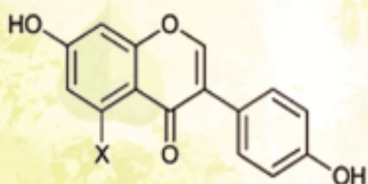
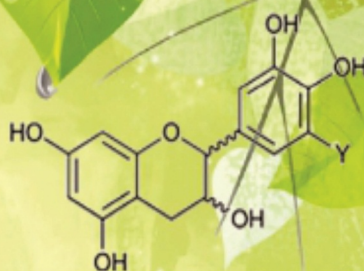
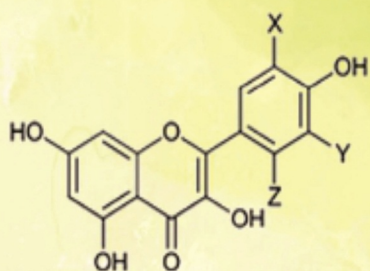
REFERENCES

- Afshari R, Angoshtari R, Kalantari S. 2011. Effects of light and different plant growth regulators on induction of callus growth in rapeseed (*Brassica napus* L.) genotypes. *Plant Omics* 4 (2): 60.
- Beckman CH. 2000. Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wild disease resistance and in general defence responses in plants? *Physiol Mol Plant Pathol* 57 (3): 101-110.
- Blount JW, Dixon RA, Paiva NL. 1992. Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.) XVI. Antifungal activity of medicarpin and its biosynthetic precursors; implications for the genetic manipulation of stress metabolites. *Physiol Mol Plant Pathol* 41 (5): 333-349.
- Cantelmo L, Soares B, Rocha L, Pettinelli J, Callado C, Mansur E, Castellar A, Gagliardi R. 2013. Repetitive somatic embryogenesis from leaves of the medicinal plant *Petiveria alliacea* L. *Plant Cell Tiss Org Cult* 115 (3): 385-393.
- Chakraborty N, Banerjee D, Ghosh M, Pradhan P, Gupta NS, Acharya K, Banerjee M. 2013. Influence of plant growth regulators on callus mediated regeneration and secondary metabolites synthesis in *Withania somnifera* (L.) Dunal. *Physiol Mol Biol Plants* 19 (1): 117-125.
- Chen J-T, Chang W-C. 2002. Effects of tissue culture conditions and explant characteristics on direct somatic embryogenesis in *Oncidium Gower Ramsey*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 69 (1): 41-44.
- Coggins Jr CW, Lovatt CJ. 2014. 14 Plant Growth Regulators. *Citrus Production Manual*, 3539, 215.
- Cui X-H, Murthy HN, Wu C-H, Paek K-Y. 2010. Sucrose-induced osmotic stress affects biomass, metabolite, and antioxidant levels in root suspension cultures of *Hypericum perforatum* L. *Plant Cell Tiss Org Cult* 103 (1): 7-14.
- Davies PJ. 2010. The plant hormones: their nature, occurrence, and functions. In: *Plant Hormones*. Springer, Berlin.
- Engida AM, Kasim NS, Tsigie YA, Ismadji S, Huynh LH, Ju Y-H. 2013. Extraction, identification and quantitative HPLC analysis of flavonoids from sarang semut (*Myrmecodia pendan*). *Ind Crops Prod*, 41: 392-396.
- Erland LA, Shukla MR, Glover WB, Saxena PK. 2017. A simple and efficient method for analysis of plant growth regulators: a new tool in the chest to combat recalcitrance in plant tissue culture. *Plant Cell Tiss Org Cult* 1-12.
- Evans DE, Coleman JOD, Kearns A. 2003. *Plant Cell Culture*. BIOS Scientific Publisher, New York.
- Fowler M. 1983. Commercial applications and economic aspects of mass plant cell culture. Paper presented at the Seminar series-Society for Experimental Biology.
- George EF, Hall MA, De Klerk G-J. 2008. Plant growth regulators II: cytokinins, their analogues and antagonists. In *Plant Propagation by Tissue Culture*. Springer, Berlin.
- George EF, Sherrington PD. 1984. *Plant Propagation by Tissue Culture (Handbook and Directory Of Commercial Laboratories)*. Eastern Press, UK.
- Ghasemzadeh A, Ghasemzadeh N. 2011. Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. *J. Med. Plants Res*, 5 (31): 6697-6703.
- Hasanuddin K, Supriadi G, Kurnia D, Adhita D. 2015. Potential of terpenoid bioactive compound isolated from Papua ant nest as an alternative ovarian cancer treatment. *Open J Obstet Gynecol* 5: 406-411.
- Hermann K, Meinhard J, Dobrev P, Linkies A, Pesek B, Heß B, Macháčková I, Fischer U, Leubner-Metzger G. 2007. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid and abscisic acid during the germination of sugar beet (*Beta vulgaris* L.): a comparative study of fruits and seeds. *J Exp Bot* 58 (11): 3047-3060.
- Kala SC, Mallikarjuna K, Aruna P. 2014. An efficient protocol devised for rapid callus induction from leaf explants of *Biophytum sensitivum* (Linn) DC. *Intl J Phytopharm* 4 (1): 20-24.
- Kefeli VI, Kaleyvitch MV, Borsari B. 2003. Phenolic cycle in plants and environment. *J Cell Mol Biol* 2 (1): 13-18.
- Kim D-O, Jeong SW, Lee CY. 2003. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chem* 81 (3): 321-326.
- Kiong ALP, Huan HH, Hussein S. 2007. Callus induction from leaf explants of *Melaleuca alternifolia*. *Intl J Agric Res* 2 (3): 227-237.

- Koes R, Verweij W, Quattrocchio F. 2005. Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways. *Trends Plant Sci* 10 (5): 236-242.
- Last DI, Brettell RI. 1990. Embryo yield in wheat anther culture is influenced by the choice of sugar in the culture medium. *Plant Cell Rep* 9 (1): 14-16.
- Leupin RE, Leupin M, Ehret C, Erismann KH, Witholt B. 2000. Compact callus induction and plant regeneration of a non-flowering vetiver from Java. *Plant Cell Tiss Org Cult* 62 (2): 115-123.
- Lindsey K, Yeoman MM. 1983. The relationship between growth rate, differentiation and alkaloid accumulation in cell cultures. *J Exp Bot* 34 (145): 1055-1065.
- Makkar HPS, Siddhuraju P, Becker K. 2007. Saponins. In *Plant Secondary Metabolites*. Humana Press. Totowa, NJ.
- Malmgren S. 1996. Orchid propagation: theory and practice. Paper presented at the North American native orchids: propagation and production. North American Native Terrestrial Orchid Conference, Germantown, Maryland.
- Manoi F. 2008. Ant-plants (*Myrmecodia*) potential medicinal plant to cure diseases. *Warta Penelitian dan Pengembangan Tanaman Industri* 14 (1): 26-30. [Indonesian].
- Miransari M, Smith D. 2009. Rhizobial lipo-chitooligosaccharides and gibberellins enhance barley (*Hordeum vulgare* L.) seed germination. *Biotechnol*, 8 (2): 270-275.
- Mohan Reddy Y, Saritha K. 2012. Callus induction and somatic embryogenesis of *Gardenia latifolia* Ait. *Intl J Curr Sci* 4: 83-89.
- Morini S, D'Onofrio C, Bellocchi G, Fisicella M. 2000. Effect of 2,4-D and light quality on callus production and differentiation from in vitro cultured young leaves. *Plant Cell Tiss Org Cult* 63 (1): 47-55.
- Müller K, Levesque-Tremblay G, Bartels S, Weitbrecht K, Wormit A, Usadel B, Haughn G, Kermod AR. 2013. Demethylesterification of Cell Wall Pectins in Arabidopsis Plays a Role in Seed Germination. *Plant Physiol*, 161 (1): 305-316.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15 (3): 473-497.
- Murthy HN, Lee E-J, Paek K-Y. 2014. Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. *Plant Cell Tiss Org Cult* 118 (1): 1-16.
- Nagata T, Takebe I. 1971. Plating of isolated tobacco mesophyll protoplasts on agar medium. *Planta* 99 (1): 12-20.
- Naik PM, Manohar SH, Praveen N, Murthy HN. 2010. Effects of sucrose and pH levels on in vitro shoot regeneration from leaf explants of *Bacopa monnieri* and accumulation of bacoside A in regenerated shoots. *Plant Cell Tiss Org Cult* 100 (2): 235-239.
- Paiva M, Janick J. 1982. In vivo and in vitro production of alkaloids in *Theobroma cacao*, L.
- Pal R, Girhepunje K, Upadhyay A, Thirumoorthy N. 2012. Antioxidant and free radical scavenging activity of ethanolic extract of the root of *Morinda citrifolia* (Rubiaceae). *Afr J Pharm Pharmacol* 6 (5): 278-282.
- Pande A, Dosad S, Chawla HS, Arora S. 2015. In-vitro organogenesis and plant regeneration from seed-derived callus cultures of finger millet (*Eleusine coracana*). *Braz. J Bot* 38 (1): 19-23.
- Perry CA, Leigh RA, Tomos AD, Wyse RE, Hall JL. 1987. The regulation of turgor pressure during sucrose mobilisation and salt accumulation by excised storage-root tissue of red beet. *Planta*, 170 (3): 353-361.
- Phua QY, Chin CK, Asri ZRM, Lam DYA, Subramaniam S, Chew BL. 2016. The Calligenic Effects Of 2, 4-Dichlorophenoxy Acetic Acid (2, 4-D) On Leaf Explants Of Sabah Snake Grass (*Clinacanthus nutans*). *Pak J Bot* 48 (2): 561-566.
- Prachayasittikul S, Buraparungsang P, Worachartcheewan A, Isarankura-Na-Ayudhya C, Ruchirawat S, Prachayasittikul V. 2008. Antimicrobial and antioxidative activities of bioactive constituents from *Hydnophytum formicarum* Jack. *Molecules* 13 (4): 904-921.
- Purnamaningsih R. 2016. Callus induction and regeneration optimization of four paddy varieties through in vitro culture. *J AgroBiogen* 2 (2): 74-80. [Indonesian]
- Radha RK, Shereena SR, Divya K, Krishnan PN, Seeni S. 2011. In vitro propagation of *Rubia cordifolia* Linn. A medicinal plant of the western ghats. *Intl J Bot* 7: 90-96.
- Robbiani D, Nurhidayati T, Jadid N. 2010. The effect of Naphthalene Acetic Acid and Kinetin combination in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leaves by in vitro culture. [Hon. Thesis]. Institut Teknologi Sepuluh November, Surabaya. [Indonesian]
- Rout GR, Samantaray S, Das P. 2000. In vitro somatic embryogenesis from callus cultures of *Cephaelis ipecacuanha* A. Richard. *Scientia Horticulturae* 86 (1): 71-79.
- Sanjaya RE, Tedjo YY, Kurniawan A, Ju Y-H, Ayucitra A, Ismadi S. 2014. Investigation on supercritical CO₂ extraction of phenolic-phytochemicals from an epiphytic plant tuber (*Myrmecodia pendans*). *J CO₂ Utiliz* 6: 26-33.
- Sari YP, Kustiawan W, Sukartingsih S, Ruchaemi A. 2017. The potential of secondary metabolites of *Myrmecodia tuberosa* from different host trees. *Nusantara Biosci* 9 (2): 170-174.
- Sari YP, Kusuma R. 2015. Modification of sucrose concentration in solid and liquid medium for *Myrmecodia tuberosa* jack callus growth in vitro. *Bio Wallacea Jurnal Ilmiah Ilmu Biologi* 1 (1): 9-13. [Indonesian]
- Shahnewaz S, Bari M. 2004. Callus Induction and plant regeneration in anther culture of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Tiss Cult* 14 (1): 37-43.
- Shi D. 2014. Effects of culture media and plant growth regulators on micropropagation of Willow (*Salix matsudana* 'Golden Spiral') and Hazelnut (*Corylus colurna* 'Te Terra Red'). [Thesis]. University of Nebraska, Nebraska, USA.
- Smetanska I. 2008. Production of secondary metabolites using plant cell cultures. In: *Food Biotechnology*. Springer, Berlin.
- Soeksmanto A, Subroto MA, Wijaya H, Simanjuntak P. 2010. Anticancer activity test for extracts of sarang semut plant (*Myrmecodia pendans*) to HeLa and MCM-Ba cells. *Pak J Biol Sci* 13: 148-151. [Indonesian]
- Stella A, Braga MR. 2002. Callus and cell suspension cultures of *Rudgea jasmimoides*, a tropical woody Rubiaceae. *Plant Cell Tiss Org Cult* 68 (3): 271-276.
- Stobbe H, Schmitt U, Eckstein D, Dujesiefken D. 2002. Developmental stages and fine structure of surface callus formed after debarking of living lime trees (*Tilia* sp.). *Ann Bot* 89 (6): 773-782.
- Subroto MA, Saputro H. 2008. Fight the disease with the ant nest plant. *Penebar Swadaya*, Jakarta. [Indonesian]
- Sudiono J, Oka CT, Trisfilha P. 2015. The Scientific Base of *Myrmecodia pendans* as Herbal Remedies. *Br J Med Med Res* 8 (3): 230-237
- Supriatno D. 2014. Antitumor activity of Papua's *Myrmecodia pendans* in human oral tongue squamous cell carcinoma cell line through induction of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 and suppression of cyclin E. *J Cancer Res Ther* 2 (3): 48-53.
- Tambe NM. 2013. Studies in in vitro callus culture of *Solanum khasianum* Clarke. *Intl J Recent Trends Sci Tecnol* 5 (3): 111-112.
- Trejo-Tapia G, Jimenez-Aparicio A, Rodriguez-Monroy M, De Jesus-Sanchez A, Gutierrez-Lopez G. 2001. Influence of cobalt and other microelements on the production of betalains and the growth of suspension cultures of *Beta vulgaris*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 67 (1): 19-23.
- Waes Jv, Debergh P. 1986. In vitro germination of some Western European orchids. *Physiol Plant* 67 (2): 253-261.
- Welsh JR, Mogeja JP. 1991. Basics of Genetics and Plant Breeding. Erlangga, Jakarta. [Indonesian]
- Yu S, Kwok KH, Doran PM. 1996. Effect of sucrose, exogenous product concentration, and other culture conditions on growth and steroidal alkaloid production by *Solanum aviculare* hairy roots. *Enzyme Microb Technol* 18 (4): 238-243.
- Zhang Y-H, Zhong J-j, Yu J-T. 1996. Enhancement of ginseng saponin production in suspension cultures of *Panax notoginseng*: manipulation of medium sucrose. *J Biotechnol* 51 (1): 49-56.
- Zulfiqar B, Abbasi NA, Ahmad T, Hafiz IA. 2009. Effect of explant sources and different concentrations of plant growth regulators on in vitro shoot proliferation and rooting of avocado (*Persea americana* Mill.) cv. "Fuerte". *Pak J Bot* 41 (5): 2333-2346.



Potensi Sarang Semut sebagai bahan Fitofarmakokimia



Yanti Puspita Sari
Chairul Saleh
Eko Kusumawati
Rudy Agung Nugroho

Potensi Sarang Semut sebagai Bahan Fitofarmakokimia



Potensi Sarang Semut Sebagai Bahan FITOFARMAKOKIMIA

Penulis : Yanti Puspita Sari
Chairul Saleh
Eko Kusumawati
Rudy Agung Nugroho

Editor : Tiyanpri Bayu Laksmono

ISBN : 978-602-6834-53-9
© 2018. **Mulawarman University Press**

Edisi : Mei 2018

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang.
Dilarang memperbanyak atau memindahkan sebagian atau seluruh isi buku ini dalam bentuk apapun tanpa izin tertulis dari penerbit.

Isi di luar tanggung jawab percetakan.

Sari, Yanti Puspita, dkk. 2018. *Potensi Sarang Semut sebagai Bahan Fitofarmakokimia*. Mulawarman University Press. Samarinda



**Mulawarman
University PRESS**

Penerbit

Mulawarman University PRESS

Gedung LP2M Universitas Mulawarman

Jl. Krayan, Kampus Gunung Kelua

Samarinda – Kalimantan Timur – Indonesia 75123

Telp/Fax (0541) 747432, Email : mup.unmul@gmail.com

PRAKATA

Bidang farmakokimia telah menjadi hal penting akhir-akhir ini. Farmakokimia berkaitan dengan penemuan, desain, dan sintesis senyawa aktif biologis dan reaksi dalam makhluk hidup. Sayangnya bahan pembuatan atau bahan dasar farmakokimia dari bahan alam terus mengalami penurunan dalam jumlah, apalagi yang berasal dari tanaman langka. Sebagai alternatif, dengan metode kultur jaringan, tumbuhan seperti sarang semut dibudidayakan dan dimanfaatkan bahan aktifnya sebagai fitofarmakokimia.

Buku ini memaparkan tentang potensi tumbuhan sarang semut (*Mymecodia tuberosa*) sebagai bahan dasar fitofarmakokimia yang memiliki antioksidan yang tinggi yang telah terbukti bersifat sebagai anti kanker dan juga bermanfaat sebagai agensia biologi seperti antibakteri, antivirus, anti jamur dan masih banyak lagi.

Untuk membagi informasi tentang senyawa-senyawa aktif dari tumbuhan sarang semut dan potensinya sebagai sumber fitofarmakokimia ini, buku tentang “potensi sarang semut sebagai bahan fitofarmakokimia” ini ditulis. Buku ini disusun sebagai bahan pengetahuan untuk menambah wawasan tentang potensi sarang semut dan bahan aktif yang terkandung. Buku ini diperuntukkan bagi mahasiswa maupun pengajar yang melakukan penelitian yang berhubungan dengan tumbuhan sarang semut serta teknik kultur jaringan dan beberapa aspek kimiawi serta mikrobiologi.

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada pemerintah Indonesia melalui KEMENRISTEK DIKTI (melalui dana hibah penelitian unggulan perguruan tinggi / pupt) no.

359/un17.41/kl/2017. Tak lupa penulis mengucapkan terima kasih kepada berbagai pihak yang telah membantu dalam pembuatan buku dan proses editing. Buku ini tentu saja jauh dari kata sempurna, untuk itu kritik dan saran yang membangun dari pembaca sangat dibutuhkan untuk perbaikan ke depan. Akhir kata, selamat membaca dan semoga berguna.

Samarinda, Mei 2018

Penulis

DAFTAR ISI

	Hal
PRAKATA.....	ii
DAFTAR ISI.....	v
DAFTAR GAMBAR.....	vii
DAFTAR TABEL.....	ix
BAB 1 Mengenal Tumbuhan Sarang Semut.....	1
1.1. Gambaran Umum.....	1
1.2 Potensi Sarang Semut.....	3
BAB 2 Taksonomi dan Morfologi Tumbuhan Sarang Semut.....	6
2.1. Taksonomi.....	6
2.2. Morfologi.....	8
BAB 3 Penyebaran Tumbuhan Sarang Semut.....	11
3.1. Penyebaran Sarang Semut.....	11
3.2. Tanaman Inang.....	13
BAB 4 Kandungan Metabolit Sekunder.....	18
4.1. Kandungan Metabolit Sekunder Tumbuhan Sarang Semut.....	18
4.2. Definisi, Klasifikasi dan Distribusi Antioksidan.....	22
4.3. Aktivitas Senyawa Fenolik dan Flavonoid.....	32
4.4. Biosintesis Senyawa Fenolik dan Flavonoid.....	38
4.5. Isolasi dan Pemurnian Senyawa Fenolik dan Flavonoid.....	44
4.6. Analisis Senyawa Fenolik dan Flavonoid.....	49
BAB 5 Potensi Antimikrobia.....	51
5.1. Bakteri.....	51
5.2. Antibakteri.....	62
5.3. Uji antibakteri Ekstrak Kalus Tanaman Sarang Semut.....	65
5.4. Daya Hambat.....	69
BAB 6 Prospek Budidaya Sarang Semut secara <i>In Vitro</i>	81

6.1. Kendala Budidaya Sarang Semut	81
6.2. Teknik Kultur Jaringan	83
6.3. Kalus sebagai sumber Metabolit Sekunder secara invitro	97
Daftar Referensi.....	105
Glosary	113
Riwayat Hidup.....	117

DAFTAR GAMBAR

	Hal
Gambar 1. Tumbuhan Sarang Semut (<i>Myrmecodi tuberosa</i>) ...	3
Gambar 2. Tumbuhan Sarang Semut a). Batang dan b). Labirin di dalam Umbi	9
Gambar 3. <i>Bagian</i> Generatif Tumbuhan Sarang Semut (a) Bunga, (b) Buah (c) Biji.	10
Gambar 4. Sketsa Distribusi Geografi Tumbuhan Sarang Semut.....	12
Gambar 5. Beberapa Jenis Pohon Inang sebagai Tempat Menempelnya Tumbuhan Sarang Semut. (a) Pohon Rambutan, (b) Pohon Cempedak, (c) Pohon Cemara	15
Gambar 6. Letak Tumbuhan Sarang Semut pada Inang. (a) Tumbuhan Sarang Semut Menempel pada Batang Inang, (b) Tumbuhan Sarang Semut Menempel pada Ranting Inang dengan Posisi Menggantung ..	15
Gambar 7. Struktur dari Fenol Sederhana.....	26
Gambar 8. Kelas Flavonoid dalam Makanan dan Sayuran.....	30
Gambar 9. Klasifikasi dari Antioksidan	32
Gambar 10. Klasifikasi dari Antioksidan Makanan.....	34
Gambar 11. Reaksi Antioksidan (A-H) dengan Radikal Bebas ...	34
Gambar 12. Reaksi Radikal Bebas Antioksidan dengan Radikal Peroksi	35
Gambar 13. Struktur Katekin dan Turunannya	37
Gambar 14. Skema dari Jalur <i>Flavonoid</i>	38
Gambar 15. Hubungan Kelas-kelas <i>Flavonoid</i>	39
Gambar 16. Biosintesis <i>Auron</i> dari jalur <i>Fenilpropanoid</i>	40

Gambar 17. Biosintesis Flavon dari <i>Tetrahidroksikalkon</i>	40
Gambar 18. Biosintesis Flavonol melalui <i>Naringenin</i> dari <i>Tetrahidroksikalkon</i>	41
Gambar 19. Biosintesis Antosianin melalui <i>Leukoantosianidin</i> dari <i>Dihidroflavonol</i>	42
Gambar 20. Zona Hambat Pengaruh Ekstrak Kalus Sarang Semut (<i>M. tuberosa</i> Jack.) terhadap Bakteri <i>S.</i> <i>aureus</i>	74
Gambar 21. Zona Hambat Pengaruh Ekstrak Kalus Sarang Semut (<i>M. tuberosa</i> Jack.) terhadap Bakteri <i>S.</i> <i>Typhi</i>	75
Gambar 22. (a) Ruang Inkubasi Kultur Jaringan (b) <i>Laminar Air</i> <i>Flow</i>	80
Gambar 23. Bahan Kimia Pembuatan Media	81
Gambar 24. Media Padat	84
Gambar 25. Media Cair	85
Gambar 26. Berbagai Zat Pengatur Tumbuh	88
Gambar 27. Budidaya tanaman sarang semut (<i>M. tuberosa</i>) secara <i>In Vitro</i> dengan Berbagai Sumber Eksplan (a) Batang (b) Nodus (c) Kotiledon (d) Umbi (e) Akar (f, g) Perakaran Sarang Semut (h) Aklimatisasi Sarang Semut	91
Gambar 28. Kalus Tanaman Sarang Semut (<i>M. tuberosa</i>) pada Media Padat dengan Perlakuan Konsentrasi Sukrosa yang Bervariasi; a=30g/L; b=60g/L; c=90g/L; d=120g/L	97
Gambar 29. Kalus Tanaman Sarang Semut (<i>M. tuberosa</i>) pada Media Cair dengan Perlakuan Konsentrasi Sukrosa yang Bervariasi; a=30g/L; b=60g/L; c=90g/L; d=120g/L.....	98

DAFTAR TABEL

	Hal
1. Berbagai Spesies dari Tumbuhan Sarang Semut (<i>Myrmecodia</i>).....	7
2. Komposisi dan Kandungan Aktif Tumbuhan Sarang Semut .	18
3. Klasifikasi Fenolik dalam Tumbuhan.....	22
4. Flavon yang Dilaporkan Terjadi pada Kayu atau Kulit Kayu .	25
5. Flavonol yang Dilaporkan Terjadi dalam Kayu atau Kulit Kayu	26
6. Nilai LC ₅₀ (ppm) Ekstrak Etanol Kalus Sarang Semut (<i>M. tuberosa</i> Jack.) terhadap <i>A. salina</i> Leach. menggunakan Pelarut Air Laut.	70
7. Rata-Rata Diameter Zona Bening Perlakuan Ekstrak Etanol Kalus Sarang Semut (<i>Myrmecodia tuberosa</i> Jack) terhadap Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> dan <i>Salmonella typhi</i>	73
8. Hasil Uji Fitokimia Umbi, Batang dan Daun Tumbuhan Sarang Semut (<i>Myrmecodia tuberosa</i> Jack.) dari Inang yang Berbeda (Durian dan Mangga) pada Pelarut Etanol	99

BAB 1

Mengenal Tumbuhan Sarang Semut

1.1. Gambaran Umum

Tumbuhan sarang semut adalah salah satu dari banyak tumbuhan obat yang tumbuh di Indonesia. Tumbuhan ini memiliki kekhasan yaitu pangkal batang menggelembung (umbi) berbentuk bulat saat muda, lalu menjadi lonjong memendek atau memanjang setelah tua. Umbi tumbuhan ini ada yang dipenuhi duri yang tajam ada juga yang tidak. Di dalam umbi terdapat labirin-labirin yang ditempati oleh semut.

Sarang semut merupakan tumbuhan dari suku *Hydnophytinae (Rubiaceae)*. Tumbuhan ini bersifat epifit, artinya menempel pada tumbuhan lain, tidak hidup secara parasit pada inangnya tetapi hanya memanfaatkannya untuk menempel. Tumbuhan sarang semut membentuk suatu hubungan simbiosis dengan semut dan jamur. Tumbuhan ini menyediakan habitat untuk koloni semut dan melindungi semut dari para pemangsa melalui duri-duri tajamnya. Labirin dalam umbi dengan lubang masuk internal, menyediakan rumah di atas tanah untuk koloni semut. Umbi tumbuhan sarang semut menghasilkan kadar gula yang amat tinggi yaitu sebesar 85%, sehingga dapat berfungsi sebagai pakan bagi semut. Bangsa semut pun membantu tumbuhan itu untuk

menyediakan pertahanan dan tidak mau merusak jaringan pohon yang merupakan rumahnya. Semut juga menyediakan nutrisi untuk tumbuhan dengan meninggalkan sisa-sisa makanan di terowongan di dalam umbi. Kelenjar-kelenjar khusus di sepanjang terowongan kemudian menyerap nutrisi yang ditinggalkan semut tadi untuk pertumbuhan tanaman.

Hubungan simbiosis ini membuat tumbuhan mendapatkan gizi dengan efektif melalui peran semut, lebih banyak dari kemampuan akar untuk mencari makanan. Di hutan di mana terdapat banyak tumbuhan ini, hanya ada satu jenis semut untuk satu tanaman. Tidak ada satu tumbuhan sarang semut dihuni oleh lebih dari 1 jenis semut. Sejauh ini, hanya tiga jenis semut yang mau tinggal di dalam batang tumbuhan ini, yang berasal dari genus *Iridomyrmex*. Manoi (2008) menyatakan bahwa Pusat Penelitian dan Pengembangan Zoologi mengidentifikasi semut tersebut sebagai *Ochetellus* sp. Satu tumbuhan sarang semut dihuni oleh satu jenis semut. Semut merasa nyaman tinggal di dalam umbi sarang semut karena tumbuhan tersebut dapat mempertahankan perubahan suhu 2-3°C. Selain simbiosis dengan semut tumbuhan sarang semut juga bersimbiosis dengan jamur. Huxley (1978) mengidentifikasi jenis jamur yang bersimbiosis pada *Myrmecodia* dan *Hydnophytum* (Gambar 1) adalah *Arthrocladium* spp.



(a)



(b)

Gambar 1. Tumbuhan Sarang Semut: (a) Genus *Myrmecodia* (b) Genus *Hydnophytum* (Huxley and Jebb's, 1993).

1.2 Potensi Sarang Semut

Tumbuhan sarang semut (*Myrmecodia tuberosa* Jack) merupakan tumbuhan asli Indonesia yang secara tradisional telah lama digunakan oleh penduduk asli untuk mengobati berbagai penyakit. Berdasarkan hasil penelitian modern didapati bahwa tumbuhan sarang semut mengandung senyawa aktif penting seperti flavonoid, tanin, tokoferol, fenolik dan kaya berbagai mineral yang sangat berguna sebagai antioksidan dan anti kanker. Flavonoid merupakan bagian penting dari diet manusia karena banyak manfaatnya bagi kesehatan. Fungsi kebanyakan flavonoid dalam tubuh manusia adalah sebagai antioksidan sehingga sangat baik untuk pencegahan kanker. Manfaat flavonoid antara lain adalah untuk melindungi struktur sel, memiliki hubungan sinergis dengan vitamin C (meningkatkan efektivitas vitamin C), antiinflamasi,

mencegah keropos tulang, dan sebagai antibiotik. Tanin merupakan astringen dan polifenol tanaman berasa pahit yang dapat mengikat dan mengendapkan protein. Umumnya tanin digunakan untuk pengobatan misalnya untuk pengobatan diare, hemostatik dan wasir. Sementara khasiat polifenol adalah anti mikroba dan mampu menurunkan kadar gula darah.

Dalam uji *in vitro*, terbukti bahwa sarang semut ampuh menghambat pertumbuhan sel kanker. Peneliti Gui Kim Tran, Yasuhiro Tezuka, Yuko Harimaya, dan Arjun menyatakan bahwa ekstrak sarang semut bersifat antiproliferasi terhadap 3 jenis kanker yaitu kanker serviks, kanker paru dan kanker usus (Manoi, 2008). Soeksmanto dkk. (2010) juga telah melakukan penelitian dan menyatakan bahwa ekstrak tumbuhan sarang semut (*M. pendens*) dapat menghalangi pertumbuhan sel kanker servik dan payudara (HeLa dan MCM-B2 cells). Jenis *Hydnophytum formicarum* mempunyai total fenolik dan antioxidant activity (AOA) yang tinggi. *H. formicarum* dapat berfungsi sebagai antioksidan dan anti mikroba.

Selain dapat mengobati kanker dan tumor, baik yang jinak atau ganas seperti: kanker otak, kanker payudara, kanker hidung, kanker paru-paru, kanker lever, kanker rahim, kanker usus, kanker kulit, dan kanker darah (leukemia), tumbuhan sarang semut juga

dapat mengobati dan gangguan jantung koroner, stroke, wasir (ambeien), benjolan dalam payudara, gangguan fungsi ginjal dan prostat, haid dan keputihan, melancarkan peredaran darah, migren (sakit kepala sebelah), penyakit paru-paru (TBC), rematik (encok), alergi hidung dan mimisan, maag, asam urat, sakit tulang, pegal-pegal, nyeri otot. Selain dapat menyembuhkan penyakit tersebut di atas, sarang semut terbukti pula dapat digunakan untuk melancarkan dan meningkatkan air susu ibu (ASI), mempercepat proses pemulihan kesehatan setelah melahirkan, memulihkan kewanitaan (sari rapet), memulihkan kesegaran dan stamina.

BAB 2

Taksonomi dan Morfologi Tumbuhan Sarang Semut

2.1. Taksonomi

Klasifikasi tumbuhan sarang semut menurut Lemmens dan Bunyapraphatsara (2003) adalah sebagai berikut:

kingdom	: Plantae
divisi	: Spermatophyta
kelas	: Dicotyledonae
ordo	: Rubiales
famili	: Rubiaceae
genus	: <i>Myrmecodia</i>
spesies	: <i>Myrmecodia tuberosa</i> Jack.

Kajian taksonomi tumbuhan sarang semut telah dilakukan sejak beberapa abad yang lalu. Penelitian pertama kali dilakukan oleh peneliti Belanda Georg Rumphius pada tahun 1750. Setelah itu, banyak peneliti yang melanjutkannya dan telah banyak terjadi revisi yang akhirnya disempurnakan oleh C. R. Huxley dan M. H. P. Jebb pada tahun 1993.

Tumbuhan sarang semut terdiri dari 5 genus yaitu *Hydnophytum*, *Myrmecodia*, *Anthorrhiza* (di daratan Papua Nugini), *Myrmephytum* (di daratan Papua Nugini dan Filipina) dan *Squamellaria* (merupakan tanaman lokal di Pulau Fiji), namun yang paling dekat berasosiasi dengan semut hanya genus *Hydnophytum* dan *Myrmecodia*. Genus *Hydnophytum* terdiri dari 45 spesies sedangkan *Myrmecodia* memiliki 26 spesies. Hingga tahun 1993

tercatat ada 26 spesies tumbuhan sarang semut dari genus *Myrmecodia* dan sebanyak 16 sub spesies atau varietas dari spesies *M. tuberosa* Semua spesies dari kedua genus ini memiliki batang yang menggelembung dan berongga-rongga. Namun dari sekian banyak spesies dari kedua genus tersebut, hanya jenis *H. formicarum*, *M. tuberosa*, *M. pendens* yang digunakan sebagai obat (Soeksmanto dkk., 2010).

Tabel 1. Berbagai Spesies dari Tumbuhan Sarang Semut (*Myrmecodia*)

No	Nama spesies	No	Nama spesies
1	<i>M. tuberosa</i> Jack	14	<i>M. angustifolia</i> Valetton
2	<i>M. kutubuensis</i> Huxley & Jebb	15	<i>M. sterrophylla</i> Merr. & Perry
3	<i>M. jobiensis</i> Becc.	16	<i>M. oksapmiminensis</i> Huxley & Jebb
4	<i>M. erinacea</i> Becc.	17	<i>M. paradoxa</i> Huxley & Jebb
5	<i>M. alata</i> Becc.	18	<i>M. aureospina</i> Huxley & Jebb
6	<i>M. beccarii</i> J.D. Hooker	19	<i>M. brassii</i> Merr. & Perry
7	<i>M. platytyrea</i> Becc.	20	<i>M. lamii</i> Merr. & Perry
8	<i>M. pendens</i> Merr. & Perry	21	<i>M. archboldiana</i> Merr. & Perry
9	<i>M. longissima</i> Valetton	22	<i>M. pteroaspida</i> Huxley & Jebb
10	<i>M. oblongata</i> Valetton	23	<i>M. melanacantha</i> Huxley & Jebb
11	<i>M. longifolia</i> Valetton	24	<i>M. horrida</i> Huxley & Jebb
12	<i>M. schlechteri</i> Valetton	25	<i>M. ferox</i> Huxley & Jebb
13	<i>M. albertisii</i> Becc.	26	<i>M. gracilispina</i> Huxley & Jebb

Sumber: (Subroto dan Saputro, 2008).

2.2. Morfologi

Menurut Huxley and Jebb's (1993), struktur morfologi tumbuhan sarang semut terdiri atas:

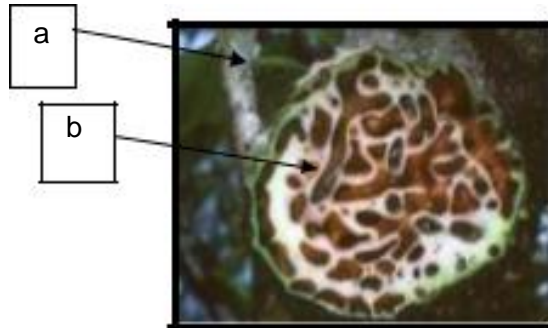
a. Umbi

Umbi pada tumbuhan sarang semut umumnya berbentuk bulat saat muda, kemudian menjadi lonjong memendek atau memanjang setelah tua. Pada jenis *Myrmecodia tuberosa* umbinya hampir selalu berduri yang berfungsi untuk melindungi diri dari pemangsa herbivora, sedangkan jenis *Hydnophyptum formicarum* umbinya memiliki suatu sistem jaringan lubang-lubang yang berbentuk serta interkoneksi dari lubang-lubang tersebut sangat khas sehingga digunakan untuk mengembangkan sistem klasifikasi dari genus ini. Umbi pada tumbuhan sarang semut menghasilkan kadar gula yang sangat tinggi sebesar 85% sehingga dapat berfungsi sebagai sumber pakan bagi semut. Bagian umbi (*caudex*) dari tumbuhan sarang semut akan menggelembung seiring bertambahnya umur. Umbi sarang semut ini ada yang berbobot 0,5-5 kg.

b. Batang

Tumbuhan sarang semut biasanya hanya memiliki satu atau beberapa cabang. Batangnya jarang ada yang bercabang. Bahkan, pada beberapa spesies tidak bercabang sama sekali. Batangnya tebal dan internodalnya sangat dekat, kecuali pada

pangkal sarang semut dari beberapa spesies. Visualisasi contoh umbi dan batang tersebut dapat dilihat pada gambar 2 berikut:



Gambar 2. Tumbuhan Sarang Semut a). Batang dan b). Labirin dalam Umbi
(Sumber:<https://www.google.co.id/search?biw=1366&bih>)

c. Daun

Daun sarang semut tebal seperti kulit. Pada beberapa spesies memiliki daun yang sempit dan panjang. Stipula (penumpu) besar dan berlawanan arah dengan tangkai daun (petiolus).

d. Bunga

Pembungaan tumbuhan sarang semut mulai terjadi saat tumbuhan sudah dewasa (beberapa ruas sudah terbentuk). Bunga muncul pada setiap nodus (buku) yang berkembang pada suatu kantong (alveolus) yang berbeda. Alveolus tersebut memiliki ukuran yang tidak sama dan terletak pada tempat yang berbeda pada batang. Kuntum bunga muncul pada dasar alveoli. Kelopak bunga biasanya terbelah pada bagian ujung.

Buah berkembang dalam cekungan dan menonjol keluar setelah masak. Bunga, buah dan bijinya dapat dilihat pada gambar 3 berikut:



(a)



(b)



(c)

Gambar 3. Bagian Generatif Tumbuhan Sarang Semut (a) Bunga, (b) Buah, (c) Biji. (Huxley and Jebb's, 1993).

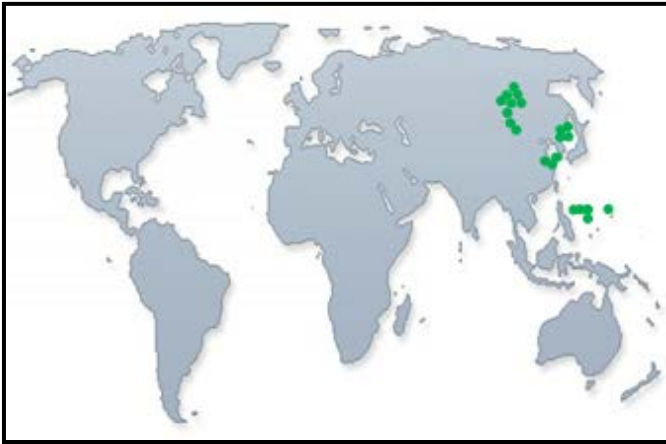
BAB 3

Penyebaran Tumbuhan Sarang Semut

3.1. Penyebaran Sarang Semut

Penyebaran sarang semut mulai dari Semenanjung Malaysia hingga Filipina, Kamboja, Sumatera, Kalimantan, Jawa, Papua, Papua Nugini, Cape York hingga Kepulauan Solomon. Di Provinsi Papua, tumbuhan sarang semut dapat dijumpai terutama di daerah Pegunungan Tengah, yaitu di hutan belantara Kabupaten Jayawijaya, Kabupaten Tolikara, Kabupaten Puncak Jaya, Kabupaten Pegunungan Bintang dan Kabupaten Paniai. Keanekaragaman terbesar dari sarang semut ditemukan di pulau Papua, di mana spesies dataran tingginya adalah lokal spesifik.

Penyebaran dari tumbuhan sarang semut berbeda-beda tergantung dari jenisnya. Untuk kelompok *Myrmecodia* sp. penyebarannya banyak ditemukan mulai dari semenanjung Malaysia hingga Filipina, kamboja, Sumatera, Kalimantan, Jawa, Papua, Papua New Guinea, Cape York hingga kepulauan Solomon yang umumnya beriklim tropis. Di Australia terdapat jenis endemik yaitu *Myrmecodia beccarii*. Jenis tersebut hanya ditemukan di Utara Australia seperti daerah Cookwan, Endeavour, dan East of Igham (Gambar 4).



Gambar 4. Sketsa Distribusi Geografi Tumbuhan Sarang Semut.
Ket. ● = Distribusi Geografi Tumbuhan Sarang Semut.

Secara ekologi tumbuhan sarang semut hidup tersebar di hutan bakau dan pohon-pohon di pinggir pantai hingga ketinggian 2400 meter di atas permukaan laut (m dpl). Tumbuhan sarang semut paling banyak ditemukan di padang rumput, hutan dan daerah pertanian terbuka dengan ketinggian 600 mdpl dan jarang ditemukan di hutan tropis dataran rendah.

Menurut Bunyapraphatsara dan Lemmens (2003), tumbuhan sarang semut tersebar luas pada habitat yang berbeda. Pada jenis *Myrmecodia tuberosa* dapat ditemukan pada hutan mangrove dan biasanya dapat ditemukan pada ketinggian lebih dari 2500 meter di atas permukaan laut. Namun dapat juga ditemukan pada hutan tropis dataran rendah (sekunder dan primer, rawa-rawa) dan daerah yang memiliki kelembapan yang tinggi, sedangkan

untuk jenis *Hydnophytum formicarum* ditemukan menempel di pohon-pohon pada hutan sekunder dan primer, hutan kerangas serta hutan mangrove dan memiliki ketinggian di atas 1000 meter di atas permukaan laut.

3.2. Tanaman Inang

Tumbuhan sarang semut menempel pada tumbuhan lain, tetapi tidak menjadi parasit bagi tumbuhan yang dijadikan tempat tumbuhnya (epifit). Tumbuhan sarang semut jarang menempel pada pohon-pohon dengan batang halus dan rapuh seperti *Eucalyptus*, namun banyak dijumpai menempel pada pohon yang memiliki batang yang keras dan kayunya biasanya digunakan untuk bahan bangunan. Tumbuhan sarang semut di Papua banyak ditemukan menempel di beberapa pohon umumnya di pohon kayu putih (*Melaleuca leucadendron*), kaha (*Castonopsis* sp.) dan pohon beech (*Nothofagus*). Kawasan hutan lindung Loksado di Pegunungan Meratus, Kalimantan Selatan terdapat beberapa jenis pohon inang yang ditemukan yaitu pohon asam (*Tamarindus indica*), pohon bayuan, pohon bijai, pohon cangkring (*Erythrina Verigata*), pohon gala-gala (*Sesbania grandiflora*), pohon gintungan (*Bischofia javanica*), pohon hambawang (*Mengifera odorata*), pohon jalamo, pohon karet (*Ficus elastica*), pohon kasturi (*Abelmoschus moschatus*), pohon kemiri (*Aleurites moluccana*),

pohon merumbang, pohon mikumbang, pohon rambutan (*Nephelium sp.*) dan pohon cempedak (*Artocarpus champeden*). Sedangkan di Kabupaten Nias, Provinsi Sumatra Utara, tumbuhan sarang semut umumnya menempel pada pohon cemara (*Casuarina junghuniana*) (Gambar 5).

Di Kalimantan Timur jenis pohon inang yang ditemukan adalah Beringin (*Ficus benjamina* Linn.), Laban (*Vitex parviflora* Juss.), Durian (*Durio zibethinus* Murr.), Pulai (*Alstonia scholaris* Linn.), Rambutan (*Nephelium lappaceum* Linn.), Nangka (*Artocarpus integra* Forst.), Langsung (*Lansium domesticum* Corr.), dan Mangga (*Mangifera indica* Linn.). Tumbuhan sarang semut lebih suka menempel pada batang pohon yang memiliki permukaan yang kasar, serta perawakan pohon yang rimbun.



(a)



(b)



(c)

Gambar 5. Beberapa Jenis Pohon Inang sebagai Tempat Menempelnya Tumbuhan Sarang Semut. (a) Pohon Rambutan, (b) Pohon Cempedak, (c) Pohon Cemara. (Gunawan dkk, 2009)

Tumbuhan sarang semut pada pohon inang ditemukan ada yang menempel pada batang, percabangan batang (ranting) ada pula yang menggantung dengan menggunakan akarnya, seperti terlihat pada gambar 6.



(a)



(b)

Gambar 6. Letak Tumbuhan Sarang Semut pada Inang. (a) Tumbuhan Sarang Semut Menempel pada Batang Inang, (b) Tumbuhan Sarang Semut Menempel pada Ranting Inang dengan Posisi Menggantung.

(Sumber:<http://dc131.4shared.com/img/120063054/6654d93c/Myrmecodia.pdf>.)

Tempat tumbuh pohon inang juga bervariasi yaitu ada yang berada pada daerah perkebunan (kebun campuran) yang terletak di pinggiran sungai, di hutan, dan kawasan pemukiman. Keberadaan tumbuhan sarang semut yang berada di pinggiran sungai dan hutan tersebut diduga erat kaitannya dengan sumber air sebagai penuplai kelembapan angka udara mikro, sedangkan tumbuhan sarang semut yang berada di pemukiman penduduk banyak disebabkan karena unsur kesengajaan yaitu ditanam. Rata-rata pohon inang tumbuhan sarang semut tersebar di seluruh daratan tropika yaitu daerah yang memiliki faktor abiotik yang tinggi seperti

iklim (curah hujan, suhu udara, kelembapan udara dan intensitas cahaya), tanah dan kondisi fisiografi lingkungan.

BAB 4

Kandungan Metabolit Sekunder

4.1. Metabolit Sekunder

Senyawa yang tidak diperlukan bagi pertumbuhan dan perkembangan normal melalui lintasan metabolik yang umum bagi semua tumbuhan kadang disebut sebagai senyawa sekunder atau produk sekunder. Ini membedakannya dengan senyawa primer seperti gula fosfat, asam amino dan amida, protein, nukleotida, asam nukleat, klorofil dan senyawa organik yang semuanya diperlukan untuk kelangsungan hidup semua tumbuhan.

Sebagian besar tumbuhan penghasil senyawa metabolit sekunder memanfaatkan senyawa tersebut untuk mempertahankan diri dan berkompetisi dengan makhluk hidup lain di sekitarnya. Tumbuhan dapat menghasilkan metabolit sekunder (seperti: quinon, flavonoid, tanin, dll) yang membuat tanaman lain tidak dapat tumbuh disekitarnya. Hal ini disebut sebagai alelopati. Berbagai senyawa metabolit sekunder telah digunakan sebagai obat atau model untuk membuat obat baru, contohnya adalah aspirin yang dibuat berdasarkan asam salisilat yang secara alami terdapat pada tumbuhan tertentu. Manfaat lain dari metabolit sekunder adalah sebagai pestisida dan insektisida, contohnya adalah rotenon dan rotenoid. Beberapa metabolit sekunder lainnya yang telah

digunakan dalam memproduksi sabun, parfum, minyak herbal, pewarna, permen karet dan plastik alami adalah resin, antosianin, tanin dan saponin.

Komposisi dan kandungan senyawa aktif yang terdapat pada tumbuhan sarang semut dapat dilihat pada Tabel 2:

Tabel 2. Komposisi dan Kandungan Aktif Tumbuhan Sarang Semut

No	Parameter	Satuan	Nilai
1	Energi	Kkal/100 g	350,52
2	Kadar air	g/ 100 g	4,54
3	Kadar abu	g/100 g	11,13
4	Kadar lemak	g/ 100 g	2,64
5	Kadar protein	g/100 g	2,75
6	Kadar karbohidrat	g/100 g	78,94
7	Tokoferol	mg/100 g	31,34
8	Total fenol	g/100 g	0,25
9	Kalsium (Ca)	g/100 g	0,37
10	Natrium (Na)	mg/100 g	68,58
11	Kalium (K)	g/100 g	3,61
12	Seng (Zn)	mg/100 g	1,36
13	Besi (Fe)	mg/100 g	29,24
14	Fosfor (P)	g/100 g	0,99
15	Magnesium (Mg)	g/100 g	1,50

Analisis kimia dari tumbuhan sarang semut menunjukkan bahwa tumbuhan ini mengandung senyawa-senyawa kimia dari golongan flavonoid dan tanin. Sari, dkk (2017) menyatakan bahwa tumbuhan sarang semut *Myrmecodia tuberosa* pada bagian daun,

umbi dan daun mengandung fenolik, flavonoid, alkaloid, saponin dan steroid. Kandungan senyawa metabolit pada daun jauh lebih tinggi dibandingkan dengan bagian lain.

Flavonoid merupakan golongan senyawa bahan alam dari senyawa fenolik yang banyak merupakan pigmen tumbuhan. Fungsi kebanyakan flavonoid dalam tubuh manusia adalah sebagai antioksidan, sehingga sangat baik untuk pencegahan kanker. Penelitian-penelitian mutakhir telah mengungkapkan fungsi lain dari flavonoid, tidak saja untuk pencegahan, tetapi juga untuk pengobatan kanker. Mekanisme kerja flavonoid lainnya adalah inaktivasi karsinogen, antiproliferasi penghambatan siklus sel, induksi apoptosis, diferensiasi, inhibisi angiogenesis serta pembalikan resistensi multi obat ataupun kombinasi dari mekanisme-mekanisme tersebut (Manoi, 2008).

Manfaat flavonoid lainnya adalah untuk melindungi struktur sel, memiliki hubungan sinergis dengan vitamin C (meningkatkan efektivitas vitamin C), antiinflamasi, mencegah tulang keropos, dan sebagai antibiotik. Flavonoid dapat berperan secara langsung sebagai antibiotik dengan mengganggu fungsi dari mikroorganisme seperti bakteri atau virus. Fungsi flavonoid sebagai antivirus telah banyak dipublikasikan, termasuk untuk virus HIV (AIDS) dan virus herpes. Selain itu, flavonoid juga berperan dalam pencegahan dan

pengobatan beberapa penyakit lain seperti asma, katarak, diabetes, encok/rematik, migren, wasir, dan periodontitis (radang jaringan ikat penyangga akar gigi).

Tanin merupakan astringen, polifenol tanaman berasa pahit yang dapat mengikat dan mengendapkan protein. Umumnya tanin digunakan untuk aplikasi di bidang pengobatan, misalnya untuk pengobatan diare, hemostatik (menghentikan pendarahan), dan wasir. Kemampuan sarang semut secara empiris untuk pengobatan ambeien (wasir) dan mimisan diduga kuat berkaitan dengan kandungan taninnya. Alkaloid memiliki keaktifan farmakologi tertentu, ada yang bersifat racun bagi manusia tetapi banyak juga yang digunakan dalam bidang pengobatan, seperti untuk menaikkan tekanan darah, mengurangi rasa sakit dan dapat melawan infeksi mikrobia.

Tumbuhan sarang semut juga mengandung tokoferol. Tokoferol berfungsi sebagai anti oksidan dan anti kanker. Tokoferol juga menangkal serangan radikal bebas dengan cara anti degeneratif. Senyawa kaya vitamin E ini mempunyai manfaat sebagai anti penuaan. Bila manusia mengkonsumsi banyak lemak dan radikal bebas, dengan adanya tokoferol akan bisa diatasi karena peran vitamin E bagi kesehatan amat vital. Vitamin E

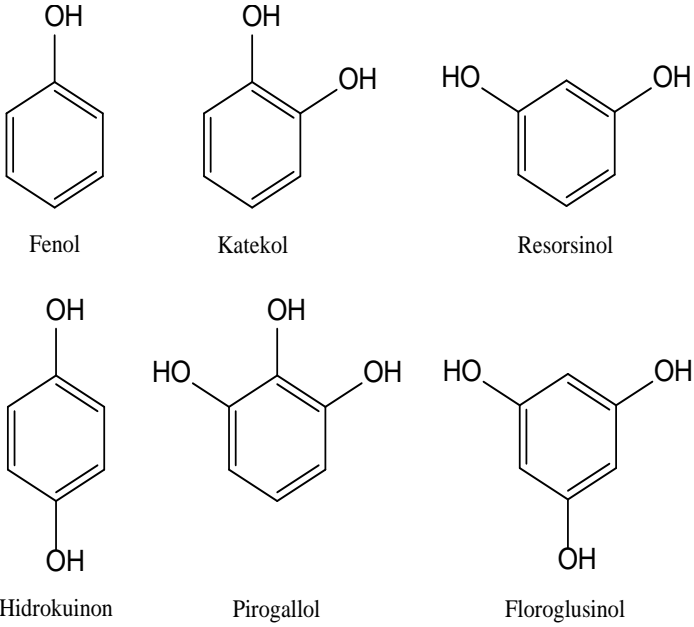
mencegah asam lemak tak jenuh, komponen sel membran dari oksidasi oleh radikal bebas (Manoi, 2008).

Dominika dan Dewi pada tahun 2008 telah melaporkan aktivitas antioksidan ekstrak fenol umbi Sarang Semut. Aktivitas antioksidan menunjukkan IC_{50} 73,48 ppm. Crisnaningtyas dan Rachmadi (2010) melaporkan pemanfaatan Sarang Semut (*Myrmecodia pendens*) sebagai antibakteri untuk bakteri gram positif dan gram negatif. Mardany dkk, (2016) melaporkan skrining fitokimia dan uji aktivitas sitotoksik dari tumbuhan Sarang Semut dari Kabupaten Merauke. Hasil skrining fitokimia menunjukkan tumbuhan Sarang Semut mengandung flavonoid dalam jumlah banyak disusul dengan saponin dan tanin dalam jumlah sedang uji aktivitas sitotoksik dari ekstrak metanol menunjukkan LC_{50} 22.86 ppm. Ariani dkk, (2014) melaporkan hasil uji skrining dan aktivitas antioksidan tumbuhan Sarang Semut. Hasil uji fitokimia ditunjukkan dalam Tabel 2 sedangkan uji aktivitas antioksidan paling tinggi dengan perebusan 30 menit dengan IC_{50} sebesar 30,3 ppm.

4.2 Definisi, Klasifikasi dan Distribusi

Senyawa fenolik atau polifenol dapat didefinisikan sebagai senyawa kimia yang memiliki cincin aromatik dengan substituen hidroksil termasuk turunannya seperti ester, metil ester, glikosida

dan lain-lain. Senyawa fenolik dapat mempunyai dua atau lebih gugus hidroksil (Gambar 7).



Gambar 7. Struktur dari Fenol Sederhana

Beberapa kelas dari polifenol seperti tanin terkondensasi mempunyai banyak gugus katekol dan floroglusinol dalam strukturnya. Klasifikasi dari fenolik dapat dilihat pada Tabel 3 (Harborne, 1989).

Tabel 3. Klasifikasi Senyawa Fenolik dalam tumbuhan

Jumlah Atom Karbon	Kerangka Dasar	Kelas	Contoh
6	C ₆	Fenol sederhana Benzokuinon	Katekol, hidrokuinon 2,6-Dimetoksibenzokuinon
7	C ₆ -C ₁	Asam fenolat	<i>p</i> -Hidroksibenzoat, salisilat

8	C_6-C_2	Asetofenon Asam fenilasetat	3-Asetil-6- metoksibenzaldehida <i>p</i> -Hidroksifenilasetat
9	C_6-C_3	Asam hidroksisinam at Fenilpropena Kumarin Isokumarin Kromon	Kafeat, ferulat Miristisin, eugenol Umbelliferon, aeskuletin Bergenin Eugenin
10	C_6-C_4	Nafthokuinon	Juglon, plumbagin
13	$C_6-C_1-C_6$	Ksanthon	Mangiferin
14	$C_6-C_2-C_6$	Stilben Anthrakuinon	Asam Lunularat Emodin
15	$C_6-C_3-C_6$	Flavonoid Isoflavanoid	Kuersetin, Sianidin Genistein
18	$(C_6-C_3)_2$	Lignan Neolignan	Pinoresinol Eusiderin
30	$(C_6-C_3-C_6)_2$	Biflavonoid	Amentoflavon
n	$(C_6-C_3)_n$ $(C_6)_6$ $(C_6-C_3-C_6)_n$	Lignin Katekol melanin Flavolan (tannin terkondensasi)	

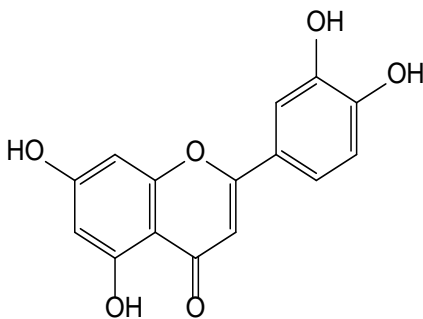
(Sumber: Harborne, 1989; Handique, 2011)

Flavonoid adalah senyawa beranggotakan 15 karbon (C_{15}) berstruktur $C_6-C_3-C_6$ dan dibagi kedalam tiga kelas besar bergantung kepada koneksi tiga karbon (C_3) terhadap dua cincin benzena. Ketiga kelas tersebut adalah 1,3-diarilpropana (kerangka flavonoid), 1,2-diarilpropana (kerangka isoflavonoid) dan 1,1-diarilpropana (kerangka neoflavonoid).

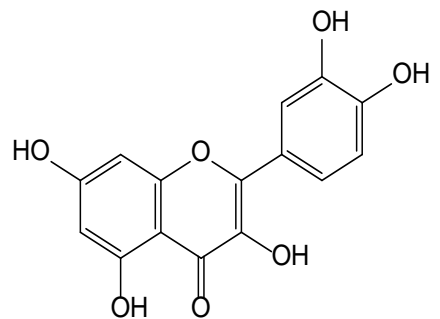
Variasi struktur dalam cincin membagi flavonoid menjadi beberapa group seperti flavon, isoflavon, flavonol, flavanol, antosianin (Handique, 2011).

A. Flavon dan Flavonol

Flavonol hanya berbeda dari flavon dalam keberadaan tambahan gugus 3-hidroksil (flavon-3-ol) dan umumnya sifat-sifat dari kedua kelas ini hampir sama. Dengan kecenderungan penyebaran alami ada kecenderungan untuk flavon menggantikan flavonoid dalam kelompok tanaman tertentu atau sebaliknya sehingga ada/tidak adanya flavon dan flavonol mungkin signifikan secara taksonomi



luteolin
(Flavon)



kuersetin
(Flavonol)

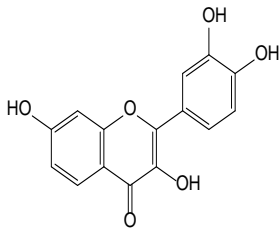
Berbagai flavon yang telah dilaporkan dalam kayu atau kulit tanaman yang lebih tinggi tercantum pada Tabel 4.

Tabel 4. Flavon yang dilaporkan terjadi pada kayu atau kulit kayu

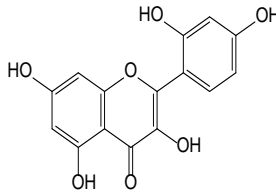
Type Structure (name)	Genus, species (family)	Location
Simple flavones		
5,6-dimethoxy	<i>Casimiroa edulis</i> (Rutaceae)	B
5,7-dihydroxy (chrysin)	<i>Pinus</i> subg. <i>Haploxyylon</i> (Pinaceae)	HW
	<i>Prunus</i> spp. (Rosaceae)	HW
5-hydroxy-7-methoxy (tectochrysin)	<i>Pinus</i> subg. <i>Haploxyylon</i> (Pinaceae)	HW
	<i>Prunus</i> spp. (Rosaceae)	HW
5,6,2'-trimethoxy	<i>Casimiroa edulis</i> (Rutaceae)	B
5,7-dihydroxy-6-methoxy (oroxylon)	<i>Oroxylum indicum</i> (Bignoniaceae)	B
5-hydroxy-7,8-dimethoxy	<i>Uvaria rufas</i> (Annonaceae)	B
5,7,8-trimethoxy	<i>Actinodaphne madraspatane</i> (Lauraceae)	HW
5,7,4'-trihydroxy (apigenin)	<i>Garcinia multiflora</i> (Hypericaceae)	HW
5,7-dihydroxy-6,4'-dimethoxy (pectolarigenin)	<i>Cassia reniger</i> (Leguminosae)	B
5,7,2',4'-tetrahydroxy (noroartocarpetin)	<i>Artocarpus</i> spp. (Moraceae)	HW
5,2',4'-trihydroxy-7-methoxy (artocarpetin)	<i>Artocarpus</i> spp. (Moraceae)	HW
5,7,3',4'-tetrahydroxy (luteolin)	<i>Prunus ssiori</i> (Rosaceae)	HW
5,4'-dihydroxy-7,3'-dimethoxy (velutin)	<i>Ceanothus velutinus</i> (Rhamnaceae)	B
5,7,8,3',4',5'-hexamethoxy	<i>Aniba</i> sp. (Lauraceae)	HW

Keterangan: B = bark (kulit), HW = heartwood, W = wood (kayu)

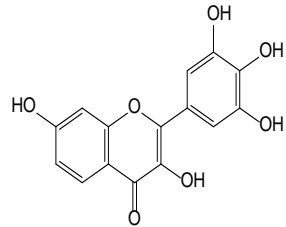
Flavonol yang dilaporkan dalam jaringan kayu tercantum dalam Tabel 5. Flavonol yang paling umum dari tumbuhan tinggi adalah kuersetin dan zat ini dilaporkan sebagai unsur yang sangat sering dari kayu dan kulit kayu gymnospermae. Dalam kayu angiospermae flavonoid yang paling sering dilaporkan termasuk fisetin karakteristik dari Anacardiaceae dan Leguminosae, robinetin dari heartwood *Robinia pesudacacia* dan morin pertama kali diisolasi dari kulit *Chlorophora tinctoria*.



fisetin
(Flavonol)



morin
(Flavonol)



robinetin
(Flavonol)

Tabel 5. Flavonol yang dilaporkan terjadi dalam kayu atau kulit kayu

Type Structure (name)	Genus, species (family)	Location
Simple flavonols		
3,7-dihydroxy	<i>Platymiscium praecox</i> (Leguminosae)	W
3,5,7-trihydroxy (galangin)	<i>Pinus griffithii</i> (Pinaceae)	W
5,7-dihydroxy-3-methoxy	<i>P. griffithii</i> (Pinaceae)	W
3,5-dihydroxy-7-methoxy	<i>P. griffithii</i> (Pinaceae)	W
	<i>P. excelsa</i> (Pinaceae)	W
	<i>Aniba riparia</i> (Lauraceae)	W
3,5,7-trimethoxy	<i>A. riparia</i> (Pinaceae)	W
3,7,4'-trihydroxy	<i>Rhus javanica</i> (Anacardiaceae)	HW
	<i>Schinopsis</i> spp. (Anacardiaceae)	HW
	<i>Platymiscium praecox</i> (Leguminosae)	W
3,5,7,4'-tetrahydroxy (kaempferol)	<i>Pinus</i> spp. (Pinaceae)	B
5,7,4'-trihydroxy-3-methoxy	<i>Didierea madagascariensis</i> (Didiereaceae)	B
3,5,7-trihydroxy-4'-methoxy	<i>Prunus mume</i> (Rosaceae)	W
3,7,8,4'-tetrahydroxy	<i>Acacia</i> spp. (Leguminosae)	HW
7,8,4'-trihydroxy-3-methoxy	<i>Acacia</i> spp. (Leguminosae)	HW
3,7,3',4'-tetrahydroxy (fisetin)	<i>Mangifera indica</i> (Anacardiaceae)	B
	<i>Pistacia chinensis</i>	HW
	<i>Rhus javanica</i>	HW
	<i>Schinopsis</i> spp.	HW
	<i>Acacia mearnsii</i> (Leguminosae)	B

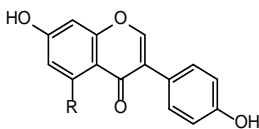
Keterangan: B = bark (kulit), HW = heartwood, W = wood (kayu)

B. Isoflavon

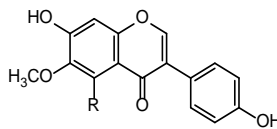
Isoflavon berbagi prekursor kalkon umum dalam biosintesis mereka dengan flavonoid dan menyerupai flavonoid dalam banyak sifatnya. Perbedaan utama adalah pada penempatan dari gugus fenil samping dalam posisi 3 bukannya di posisi 2 sehingga isoflavon semua turunan dari 3-fenilkroman. Sama seperti flavon, flavanon

dan flavan pada tingkat oksidasi yang berbeda dalam cincin piran pusat sehingga ada isoflavanon, isoflavanon dan isoflavan. Ada juga kelas baru isoflavonoid yang tidak secara langsung diwakili dalam seri flavonoid seperti pterokarpan dan kometan. Isoflavanon adalah kelompok paling banyak diantara isoflavonoid. Neoflavonoid adalah kelompok lebih lanjut dari heterosiklik oksigen yang berhubungan dengan flavonoid yang secara formal dapat diturunkan dari kerangka 4-fenilkroman. Struktur rantai terbuka terkait sesuai dengan kalkon dikenal sebagai senyawa 1,4-kuinon. Neoflavonoid sebagai kelompok juga bisa dianggap sebagai turunan kumarin yaitu 4-fenilkumarin.

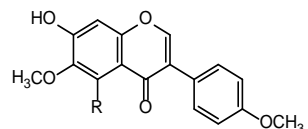
Menurut Wong, Dewick dan Ingham jumlah struktur yang dikenal dari isoflavonoid sekurangnya 630 senyawa dan sekitar setengah senyawa ini telah diisolasi dari jaringan berkayu Leguminosae. Beberapa isoflavanon dapat dilihat pada gambar berikut (Harborne, 1989):



R = H daidzein
R = OH genistein



R = H glisitein
R = OH tectorigenin



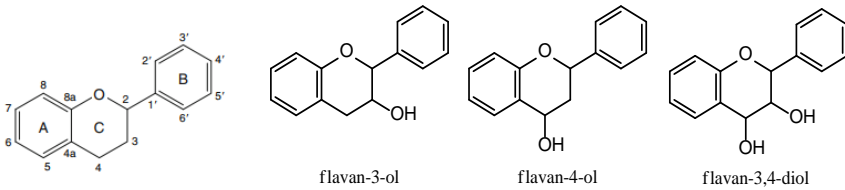
R = H afrormosin
R = OH 5-metilafroformosin

C. Flavanol

Flavanol moomer dan proantosianidin adalah senyawa polifenol yang berasal dari metabolisme sekunder tanaman yang

hadir dalam berbagai tanaman dan makanan yang berasal dari taumbuhan seperti buah-buahan, sereal, biji-bijian, anggur, teh, bir dan coklat (Gambar 8). Flavanol terlibat dalam perlindungan terhadap abiotik (misalnya sinar matahari) dan tekanan biotik (misalnya serangan predator dan patogen) dari tanaman. Flavanol juga dapat berkontribusi terhadap warna beberapa produk makanan seperti anggur merah, di satu sisi berhubungan dengan antosianin (fenomena kopigmentasi) yang meningkatkan warna anggur merah.

Flavan-3-ol, flavan-2-ol dan flavan-3,4-diol adalah kelas flavanoid yang berbeda senyawa yang terdiri dari struktur umum C_{15} ($C_6-C_3-C_6$) dari bagian benzopiran (cincin A dan C) yang menghadirkan cincin aromatik (cincin B) yang terkait dengan karbon C-2 dari cincin C piran. Perbedaan antara masing-masing kelas ini adalah dalam pola hidroksilasi dari cincin piran. Di sisi lain dalam kasus flavan-3-ol, flavan-4-ol dan flavan-3,4-diol ada gugus hidroksil di karbon C-3, C-4 atau C-3 dan C-4. Flavan tidak ada gugus hidroksil dalam cincin piran (Oliveira, 2013). Struktur flavan dan turunannya dapat dilihat pada gambar berikut:

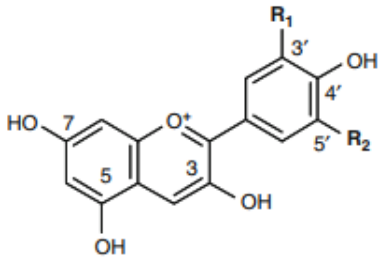


D. Antosianin

Antosianin adalah kelompok fenolik tanaman yang dicirikan oleh warna biru-oranye. Antosianin tidak hanya dapat digunakan sebagai pewarna alami dalam industri makanan tetapi juga dapat berinteraksi dengan komponen tanaman lain yang mempengaruhi karakteristik akhir produk yang diproses. Antosianin dapat dianggap sebagai bahan fungsional dan telah menunjukkan sebagai target potensial untuk industri farmakologi (Teresa *dkk.*, 2013).

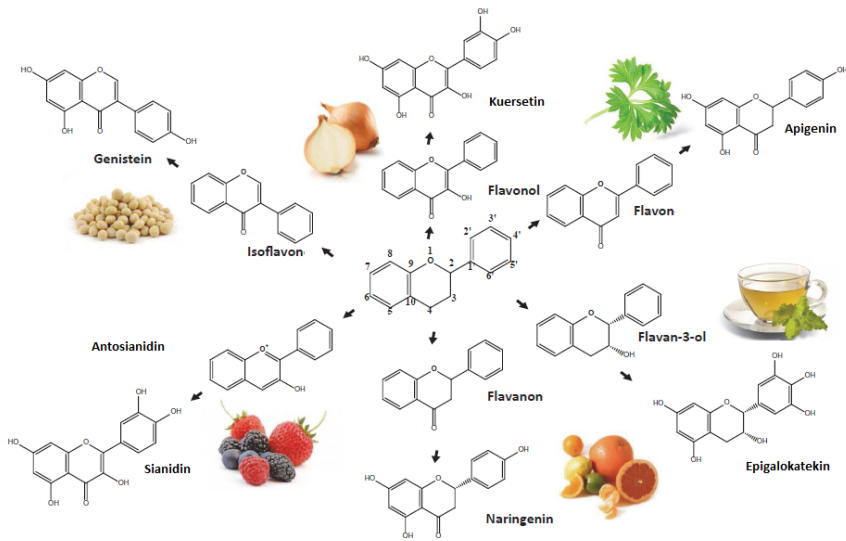
Istilah antosianin berasal dari kata Yunani *anthos* yang berarti bunga dan *kyanos* yang berarti biru. Antosianin merupakan kelompok terbesar yang larut dalam air. Antosianin bertanggung jawab untuk warna bunga yang menarik, buah-buahan, dan sayuran sehingga menambah kualitas estetika produk yang berasal dari banyak sumber tanaman. Antosianin adalah glikosida dari polihidroksi dan turunan polimetoksi dari 2-fenilbenzopirilium atau garam flavilium. Blikosilasi dan asilasi gugus alglikon (terutama enam antosianidin (pelargonidin, sianidin, peonidin, delphinidin, petunidin dan malvidin) oleh gula dan asam yang berbeda pada posisi yang berbeda menjelaskan struktur yang luas dari

keragaman pigmen ini. Struktur senyawa keenam aglikon tersebut dapat dilihat pada gambar berikut:



R ₁	R ₂	Anthocyanidin
H	H	Pelargonidin
OH	H	Cyanidin
OH	OH	Delphinidin
OH	OCH ₃	Petunidin
OCH ₃	H	Peonidin
OCH ₃	OCH ₃	Malvidin

Antosianin hadir di organ tanaman yang berbeda seperti buah, bunga, batang, daun dan akar. Pigmen-pigmen ini biasanya ditemukan terlarut secara merata dalam larutan vakuola dari sel epidermis. Namun pada spesies tertentu antosianin terlokalisasi di daerah diskrit vakuola sel yang disebut antosianoplas. Sumber utama antosianin adalah buah merah terutama buah beri dan anggur merah, sereal terutama jagung dan sayuran seperti terung.

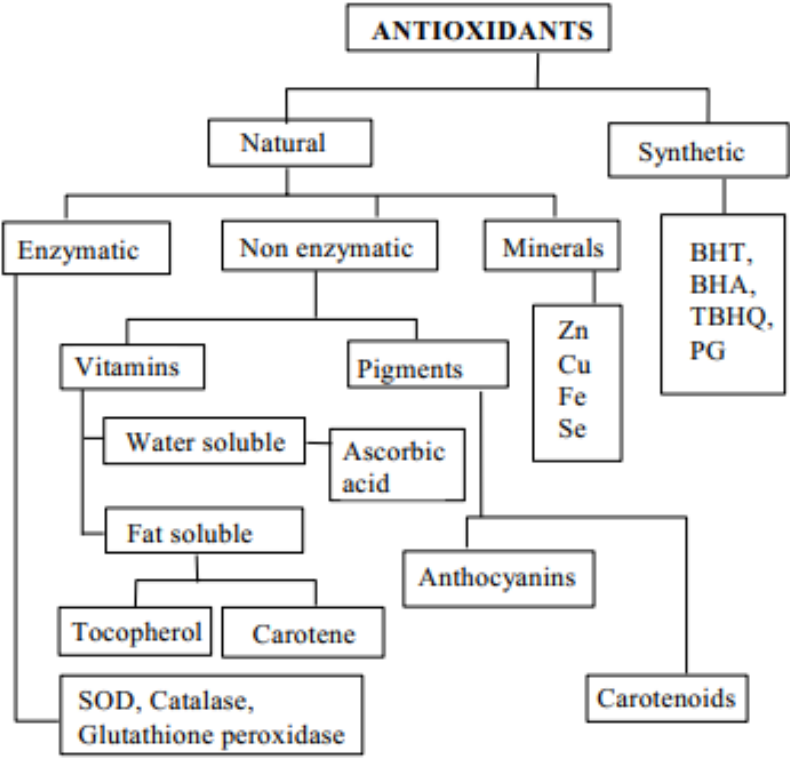


Gambar 8. Kelas flavonoid dalam Makanan dan Sayuran (Swanson, 2016)

4.3 Aktivitas Antioksidan Senyawa Fenolik dan Flavonoid

Dalam sistem biologi, suatu antioksidan didefinisikan sebagai zat apa saja pada konsentrasi rendah dibandingkan dengan zat yang teroksidasi secara signifikan menunda atau mencegah oksidasi zat itu dan bertindak sebagai *free radical scavenger*. Klasifikasi antioksidan cukup rumit karena tidak ada aturan pasti untuk mengklasifikasinya. Ini dapat diklasifikasikan sebagai antioksidan yang larut dalam air dan antioksidan yang larut dalam lemak, antioksidan dengan berat molekul rendah dan berat molekul tinggi, antioksidan nonenzimatik dan antioksidan enzimatik, Antioksidan enzimatik selanjutnya diklasifikasikan sebagai

antioksidan enzim primer seperti superoxide dismutase (SOD), katalase, glutation, dan antioksidan enzim sekunder seperti glutatin reduktase, dehidrogenase. Antioksidan nonenzimatik termasuk vitamin A, C, E. Berdasarkan pada ketersediaannya, antioksidan juga diklasifikasikan sebagai antioksidan alami dan antioksidan sintetik. Klasifikasi antioksidan dapat dilihat pada gambar 9 berikut:



Gambar 9. Klasifikasi dari Antioksidan

Contoh dari antioksidan alami adalah tanaman bifenol, polifenol, flavonoid dan lain-lain. Antioksidan sintetik seperti tersier butil hidrokuinon (TBHQ), hidroksi anisol terbutilasi (BHA), hidroksil

toluen terbutilasi (BHT) dan protil galat (PG) yang memiliki kapasitas antioksidan sama atau kurang dari antioksidan alami. Klasifikasi antioksidan pada makanan secara tradisional dibagi menjadi dua kelas yaitu antioksidan primer atau pemecah rantai dan antioksidan sekunder atau antioksidan pencegah. Antioksidan sekunder menghambat laju oksidasi. Antioksidan primer hadir dalam jumlah sedikit dapat menunda atau menghambat langkah inisiasi reaksi berantai. Hal ini dapat dilihat pada Gambar 10.

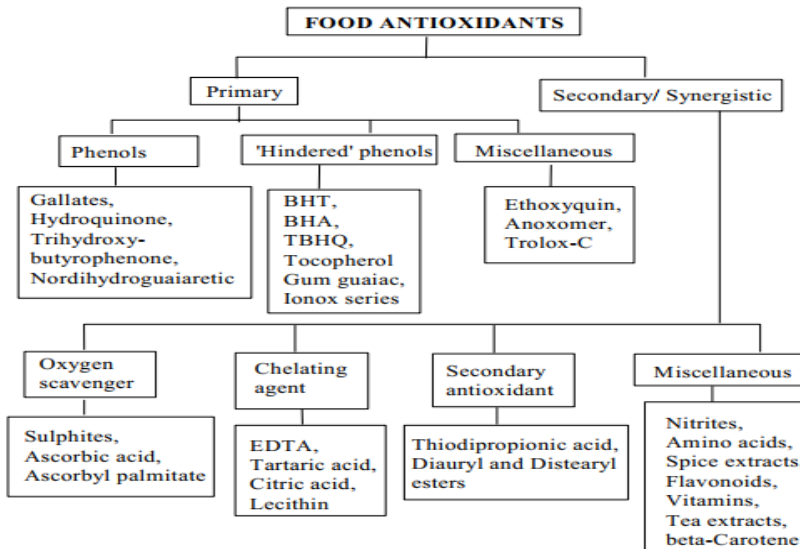
Mayoritas antioksidan tanaman adalah flavonoid, isoflavonod, flavon, antosianin, kumarin, lignan, katekin dan isokatekin. Beberapa peneliti telah menunjukkan langsung hubungan antara kandungan antioksidan dan polifenol dari ekstrak tumbuhan.

Polifenol bersifat multifungsi dan aktivitas antioksidan mungkin karena kapasitasnya untuk bertindak sebagai agen pereduksi non-enzimatik. Khasiat fenol bertindak sebagai antioksidan dalam sistem biologi bergantung pada kemampuannya:

- (i). Untuk mencegah dan menonaktifkan yang berpotensi merusak dari radikal bebas
- (ii). Untuk memperbaiki biomolekul rusak atau bioradikal

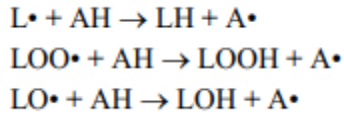
Mekanisme aktivitas antioksidan mereka mungkin karena kemampuannya dalam:

- (a) Untuk menghambat reaksi propagasi rantai radikal bebas seperti menyumbangkan hidrogen ke radikal peroksil untuk membentuk spesies bebas stabil
- (b) Untuk peredaman oksigen singlet
- (c) Untuk mencegah pembentukan radikal bebas dengan mengkhelat ion logam aktif secara redoks



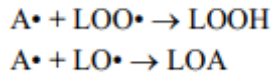
Gambar 10. Klasifikasi dari Antioksidan Makanan

Dengan demikian polifenol dapat bertindak sebagai antioksidan primer (A-H) yang dapat menunda atau menghambat langkah inisiasi reaksi berantai dengan radikal lipid atau menghambat langkah propagasi reaksi dengan radikal alkil, peroksil atau alkoksil seperti gambar 11 berikut:



Gambar 11. Reaksi Antioksidan (A-H) dengan Radikal Bebas

Radikal bebas antioksidan lebih lanjut dapat menghambat reaksi propagasi rantai dengan membentuk senyawa antioksidan peroksi, seperti gambar 12 berikut:



Gambar 12. Reaksi radikal bebas antioksidan dengan radikal peroksi

Energi aktivasi dari reaksi di atas meningkat dengan meningkatnya energi disosiasi ikatan A-H. Oleh karena itu lebih rendah adalah energi ikatan disosiasi (*bond dissociation energy* = BDE) lebih tinggi adalah kapasitas antioksidan AH.

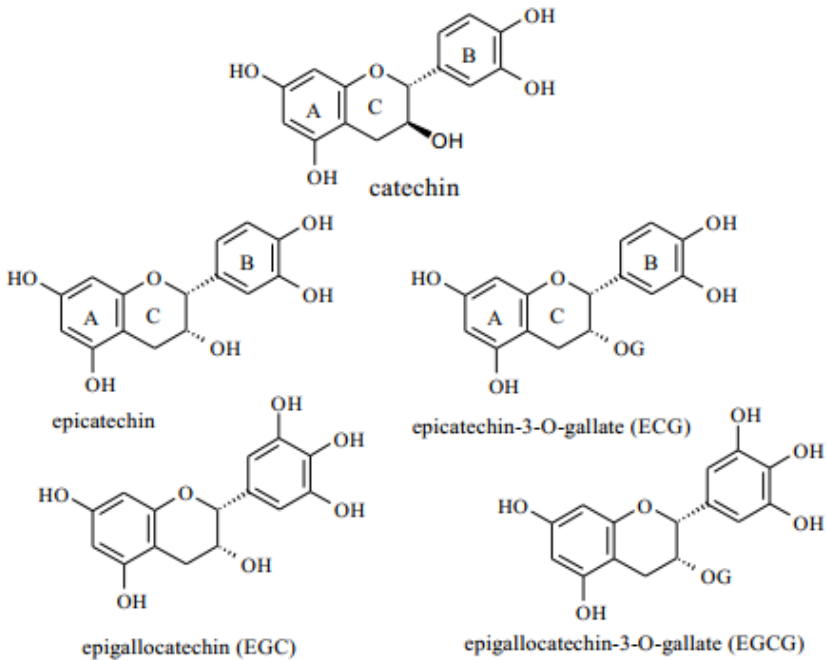
Selain mekanisme di atas, polifenol dapat bertindak sebagai antioksidan oleh mekanisme lain. Jadi atas dasar mekanisme yang terlibat, uji kapasitas antioksidan dapat dibagi menjadi dua kategori:

- (i). Reaksi berdasarkan pengujian transfer atom hidrogen (*hydrogen atom hydrogen* = HAT)
- (ii). Pengujian berdasarkan reaksi transfer elektron tunggal (*single electron transfer* = SET)

Kapasitas antioksidan dari beberapa senyawa fenolik yang bekerja sebagai antioksidan primer telah dinilai oleh sejumlah pengujian, seperti:

- (i). Evaluasi dari scavenging spesies oksigen reaktif seperti radikal anion superoksida, radikal peroksil, dan radikal hidroksil.
- (ii). Scavenging dari radikal non biologis lainnya seperti radikal kation 1,1-difenil-2-pikril hidrazil (DPPH), 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfonat (ABTS⁺)
- (iii). Pengukuran efek penghambatan enzimatik dan non-enzimatik dari lipid peroksida secara luas digunakan

Asam ferulat menunjukkan aktivitas penghambatan tertinggi terhadap degradasi deoksiribosa tetapi tidak ada hubungan struktur-aktivitas yang dapat dibentuk untuk aktivitas senyawa fenolik dalam uji deoksiribosa. Efikasi dari senyawa fenolik berbeda tergantung pada mekanisme aksi antioksidan dalam uji yang digunakan dengan dimer proantosianidin dan flavan-3-ol menunjukkan aktivitas yang sangat kuat dibandingkan dengan glutathion, a-tokoferol, ergotionin, dan antioksidan BHA, BHT. Katekin, suatu monomer flavanol dilaporkan memiliki hidroksil, peroksil, superoksida dan aktivitas scavenging radikal DPPH. Struktur katekin dan turunannya ditunjukkan dalam gambar 13 (Handique, 2011).



Gambar 13. Struktur Katekin dan Turunannya

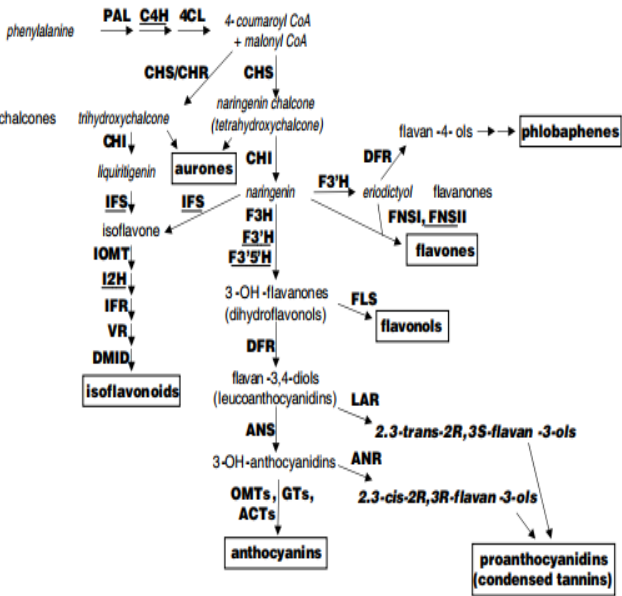
4.4 Biosintesis Senyawa Fenolik dan Flavonoid

Flavonoid telah lama memicu minat sebagian besar para ilmuwan dan non-ilmuwan karena metabolit ini menyebabkan banyak warna merah, biru dan ungu merupakan pigmen yang ditemukan pada tumbuhan dan semakin banyak dikaitkan dengan kesehatan seperti anggur, coklat dan umumnya buah dan sayuran. Jalur biosintesis flavonoid seperti ditunjukkan pada Gambar 14.

Ada bukti bahwa sistem ini berasal dari metabolisme utama dengan berbagai enzim termasuk sitokrom P450 hidrosilase, 2-oksoglutarat bergantung dioksigenase (2-ODD), dehidrogenase

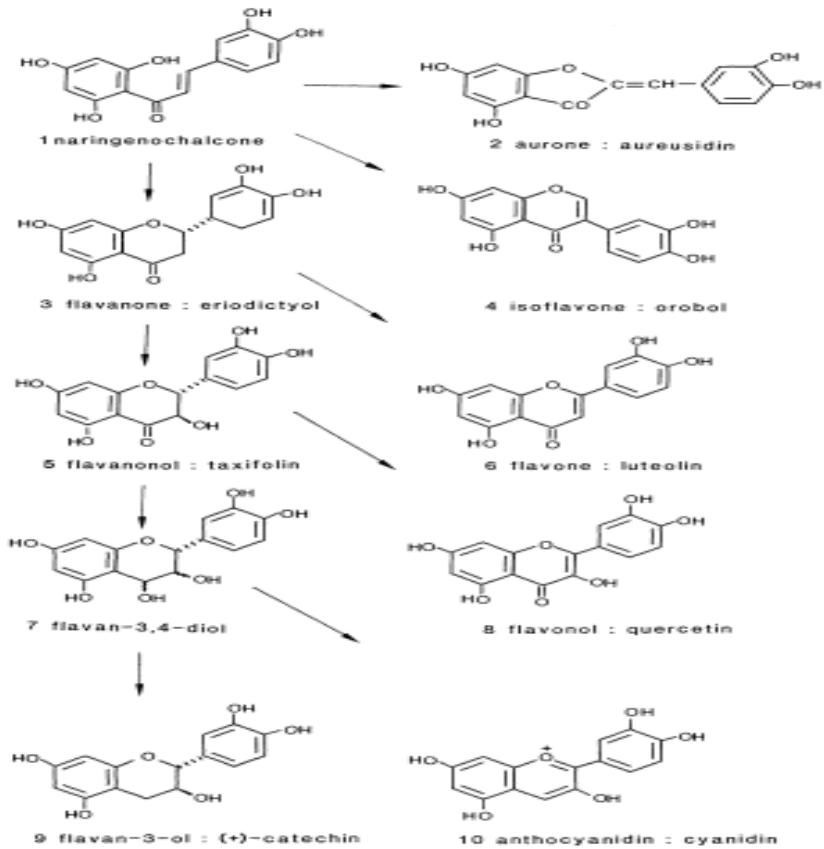
rantai pendek/ reduktase (SDR), O-metiltransferase (OMT) dan glikosiltransferase (GT).

Hingga saat ini lebih dari 6.400 senyawa flavonoid yang berbeda telah dijelaskan dalam literatur dan jalur yang bertanggung jawab untuk sintesa mereka telah dicirikan secara rinci di banyak spesies tanaman (Winkel, 2006).



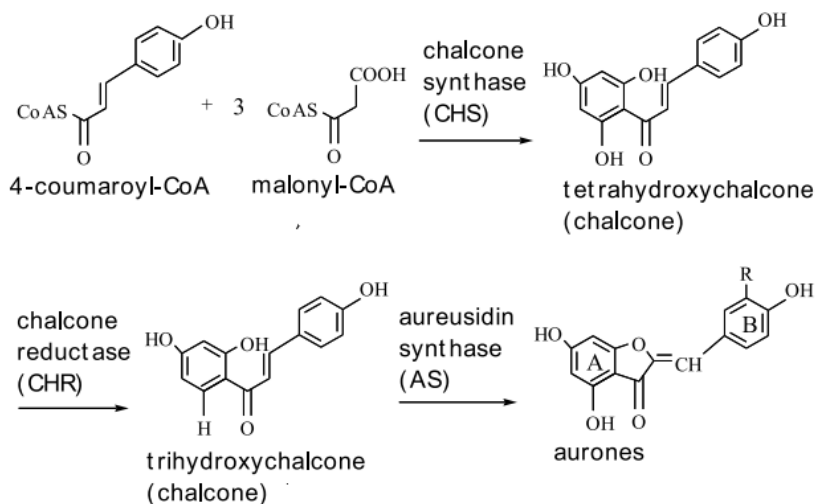
Gambar 14. Skema dari Jalur Flavonoid

Hubungan kelas-kelas flavonoid (Harborne, 1989) dapat dilihat pada Gambar 15 berikut:



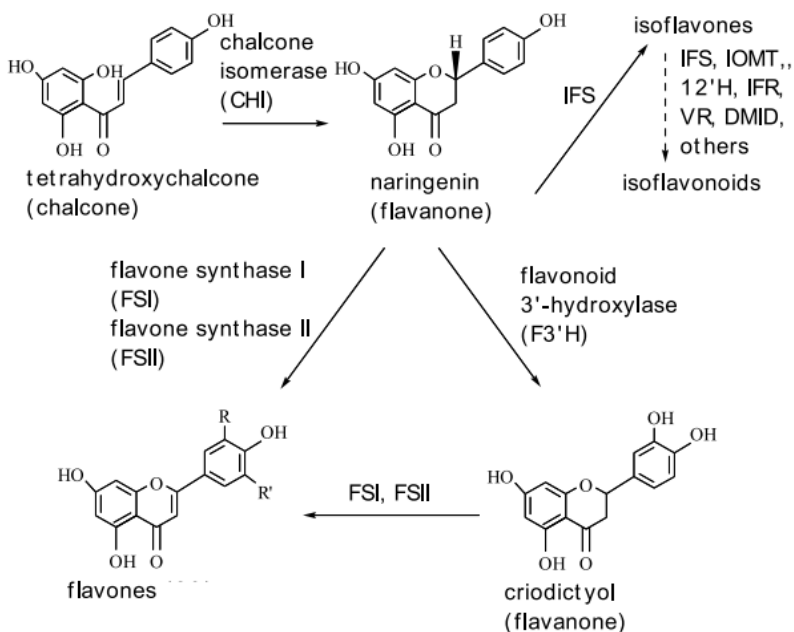
Gambar 15. Hubungan Kelas-kelas Flavonoid

Auron disintesa dari 4-kumaroil-CoA dan malonil-CoA melalui tetrahidrokalkon dan trihidroksikalkon menggunakan kalkon sintase (CHS) dan kalkon reduktase (CHR). Aureusidin sintase (AS) mengubah trihidroksikalkon menjadi auron (Gambar 16).



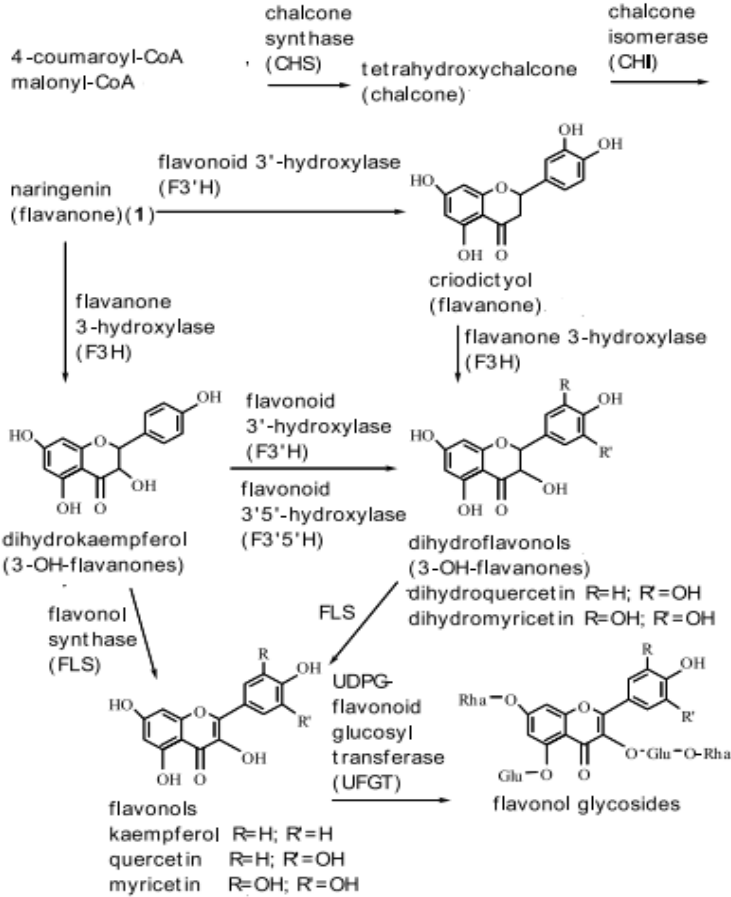
Gambar 16. Biosintesis Auron dari Jalur Fenilpropanoid

Tetrahidrosikalkon diubah menjadi naringenin oleh kalkan isomerasi (CHI) dan kemudian ke flavon oleh flavon sintase (FSI) dan flavon sintase II (FSII) (Gambar 17).



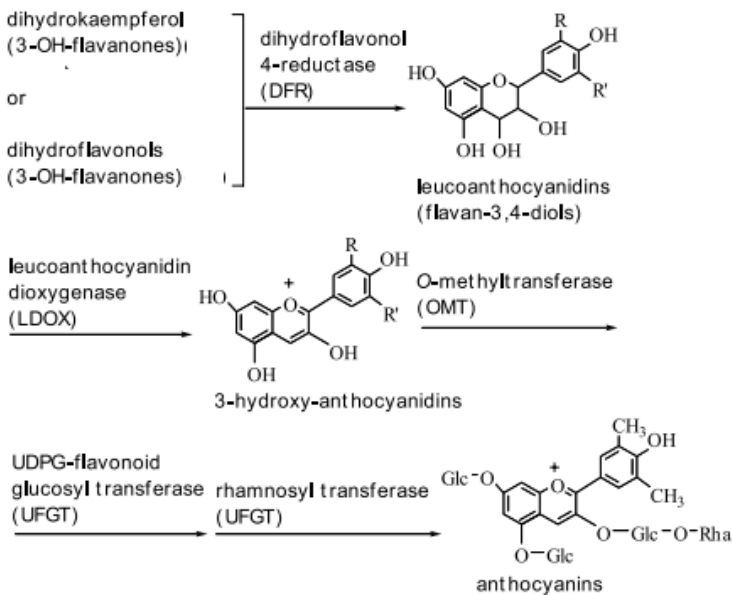
Gambar 17. Biosintesis Flavon dari Tetrahidrosikalkon

Flavono sintase (FLS) mengkonversi dihidrokaempferol menjadi flavonol. Demikian pula flavonol sintase mengubah dihidroflavonol (3-OH flavanon) menjadi flavonol seperti kaempferol, kuersetin dan mirisetin. Kemudian UDPG-flavonoid glukosil transferase (UFGT) mengkonversi flavonol menjadi flavonol glikosida (Gambar 18).



Gambar 18. Biosintesis Flavonol melalui Naringenin dari Tetrahidroksikalkon

Dihidroflavonol 4-reduktase (DFR) mengubah dihidroflavonol (3-OH flavanon) menjadi leukoantosianidin (flavan-3,4-diol). Leukoantosianidin diubah oleh leukoantosianidin dioksigenase (LDOX) menjadi 3-hidroksiantosianidin. Akhirnya 3-hidroksiantosianidin diubah oleh tiga enzim yaitu O-metiltransferase (OMT), UDPG-flavonoid glukosil transferase (UFGT) dan ramnosil transferase menjadi antosianin (Gambar 19) (Motohashi & Sakagami, 2009)



Gambar 19. Biosintesis Antosianin melalui Leukoantosianidin dari Dihidroflavonol

4.5 Isolasi dan Pemurnian Senyawa Fenolik dan Flavonoid

Flavonoid dan konjugasinya membentuk kelompok produk alami yang sangat besar. Mereka ditemukan dalam banyak jaringan tanaman, dimana mereka hadir di dalam sel atau dalam permukaan organ tanaman yang berbeda.

Dalam kingdom tumbuhan, famili tanaman yang berbeda memiliki pola khas flavonoid dan konjugatnya. Semua senyawa ini berperan penting baik peran biokimia dan fisiologis dalam berbagai jenis sel atau organ (biji, akar, bagian hijau, buah) dimana mereka terakumulasi. Kelas flavonoid yang berbeda dan konjugatnya banyak fungsi selama interaksi tanaman dengan lingkungan baik dalam kondisi stres biotik dan abiotik. Selain itu konjugat flavonoid karena mereka umum hadir dalam tanaman merupakan komponen penting dari diet manusia dan hewan. Karena aktivitas biologis yang berbeda dari metabolit sekunder tanaman, konsumsi mereka dapat memiliki konsekuensi serius bagi kesehatan baik positif dan negatif. Untuk alasan tersebut, metode yang efisien dan analisis dari flavonoid memainkan peranan penting dalam penelitian yang dilakukan dalam berbagai bidang ilmu biologi dan medis.

Metode yang berbeda dari isolasi produk alami dapat diterapkan dan pemanfaatan berbagai strategi tergantung pada asal bahan biologis produk alami target menjadi diekstrak (tumbuhan atau jaringan hewan atau cairan tubuh). Dalam kasus

senyawa polifenol sering penting untuk awalnya menentukan apakah peneliti tertarik pada identifikasi masing-masing komponen yang ada dalam campuran senyawa target atau apakah mereka ingin mengestimasi jumlah total dari senyawa fenolik dalam bahan biologis yang diselidiki. Pendekatan kedua ini paling sering terjadi selama studi nutrisi pada makanan yang berbeda terutama dari asal tumbuhan.

Adanya karbohidrat dan/atau substansi lipofilik dapat mempengaruhi profil dari komposisi kualitatif dan kuantitatif dari flavonoid dan turunannya dalam ekstrak yang diperoleh. Kita harus mempertimbangkan yang disebut di atas mengenai pemilihan metode untuk preparasi dan ekstraksi sampel, dan dalam banyak kasus pembersihan tambahan berdasarkan ekstraksi fase padat (*solid-phase extraction* = SPE) dari ekstrak sampel yang digunakan.

Pemanfaatan dari bahan tanaman kering untuk ekstraksi dapat menyebabkan substansi menurun dalam hasil konjugas flavonoid. Glikosida flavonoid terasilasi terutama labil pada suhu tinggi dan sering terdegradasi secara termal selama proses pengeringan jaringan tanaman. Hal ini penting selama profil kelas produk alami ini dalam penelitian yang diarahkan untuk menyelidiki dari peran fisiologis dan biokimianya pada tumbuhan

di bawah pengaruh faktor lingkungan atau dalam studi tanaman rekayasa genetika untuk penjelasan perubahan jalur metabolik.

Aglikon flavonoid bebas yang dikeluarkan oleh jaringan tanaman (daun atau akar) dapat dicuci dari permukaan dengan pelarut nonpolar seperti metilen klorida, etil eter atau etil asetat. Tetapi konjugat glikosidik lebih polar larut dalam pelarut polar (metanol dan etanol) dan pelarut organik ini digunakan untuk prosedur ekstraksi dalam aparatus Soklet. Campuran dari alkohol dan air dalam rasio berbeda digunakan untuk ekstraksi dari flavonoid dan konjugatnya dari bahan biologis padat (tumbuhan, jaringan hewan dan produk makanan yang berbeda). Efisiensi ekstraksi dapat ditingkatkan dengan penggunaan ultrasonikasi atau ekstraksi cair bertekanan (*pressurized liquid extraction* = PLE), suatu prosedur yang digunakan pada suhu tinggi mulai dari 60°C hingga 200°C.

Ekstraksi cairan superkritik dengan karbon dioksida juga dapat digunakan dengan prosedur yang disesuaikan karena kemungkinan degradasi termal dari turunan flavonoid. Dalam banyak kasus, pemurnian lebih lanjut dan/atau prakonsentrasi fraksi senyawa target diperlukan. Ekstraksi cair-cair (*liquid-liquid extraction* = LLE) atau SPE paling sering digunakan.

Pemilihan prosedur ekstraksi untuk memperoleh konjugat flavonoid dari bahan biologi sangat penting dan tergantung pada tujuan yang dilakukan peneliti. Dalam hal ini jumlah bahan biologi untuk isolasi produk alami mungkin sangat kecil dan penggunaan teknik mikroekstraksi diperlukan.

Flavonoid (terutama glikosida) dapat terdegradasi oleh aksi enzim ketika pengumpulan bahan tanaman segar atau tidak kering. Karena itu disarankan untuk menggunakan sampel kering. Ketika bahan tanaman kering digunakan umumnya digiling menjadi serbuk. Untuk ekstraksi pelarut dipilih sebagai fungsi dan jenis flavonoid yang diperlukan. Polaritas penting dipertimbangkan disini. Flavonoid kurang polar (misalnya isoflavon, flavanon, flavon termetilasi dan flavonol) diekstraksi dengan kloroform, diklorometana, dietil eter, atau etil asetat sedangkan glikosida flavonoid dan aglikon lebih polar diekstraksi dengan alkohol atau campuran alkohol-air. Glikosida meningkat kelarutannya dalam air dan alkohol berair. Sebagian besar bahan yang mengandung flavonoid masih dilakukan dengan ekstraksi pelarut sederhana.

Serbuk bahan tanaman dapat juga diekstraksi dalam alat Soxhlet, pertama dengan n-heksana, untuk menghilangkan lipid dan kemudian dengan etil asetat atau etanol untuk mendapatkan

fenolik. Pendekatan ini tidak cocok untuk senyawa yang peka terhadap panas.

Prosedur yang nyaman dan sering digunakan adalah ekstraksi pelarut berurutan. Langkah pertama dengan diklorometana, misalnya akan mengekstrak aglikon flavonoid dan bahan kurang polar. Langkah selanjutnya dengan alkohol akan mengekstrak glikosida flavonoid dan konstituen polar. Glikosida flavanon dan kalkon tertentu sulit larut dalam metanol, etanol atau campuran alkohol-air. Kelarutan flavanon tergantung pada pH air yang mengandung larutan.

Flavan-3-ol (katekin, proantosianidin dan tanin) dapat diekstraksi langsung dengan air. Namun, komposisi dari ekstrak tidak bervariasi dengan pelarut, apakah air, metanol, etanol, aseton, atau etil asetat. Misalnya metanol adalah pelarut terbaik untuk katekin dan aseton 70% untuk prosianidin.

Antosianin diekstraksi dengan metanol yang diasamkan. Asam yang digunakan biasanya asam asetat 7% atau asam trifluoroasetat (TFA) 3%. Penggunaan asam mineral bisa menyebabkan hilangnya gugus asil.

Ekstraksi biasanya dilakukan dengan pengadukan magnetik (*magnetic stirring*) atau shaker tetapi metode lain diperkenalkan untuk meningkatkan efisiensi dan kecepatan prosedur ekstraksi.

Prosedur pertama disebut ekstraksi cair bertekanan (*pressurized liquid extraction* = PLE). Dengan metode ini ekstraksi dipercepat dengan menggunakan suhu dan tekanan tinggi. Ada peningkatan difusivitas dari pelarut dan kemungkinan bekerja di bawah tekanan atmosfer. Penerapan PLE memberikan hasil lebih baik dari maserasi dan waktu ekstraksi lebih pendek dan jumlah pelarut yang lebih sedikit.

Ekstraksi cairan superkritis (*supercritical fluid extraction* = SFE) bergantung pada sifat pelarutan cairan superkritis. Viskositas yang lebih rendah dan tingkat difusi cairan superkritis yang lebih tinggi dibandingkan dengan cairan.

4.6 Analisis Senyawa Fenolik dan Flavonoid

Spektroskopi UV telah menjadi teknik utama untuk analisis struktur flavonoid karena dua alasan utama yaitu (1) hanya sejumlah kecil material yang diperlukan. Seringkali spot tunggal flavonoid pada kromatogram kertas akan menghasilkan senyawa yang cukup untuk beberapa spektrum UV; (2) jumlah informasi struktural yang diperoleh dari spektrum UV cukup ditingkatkan dengan penggunaan reagen spesifik yang bereaksi dengan satu atau lebih banyak gugus fungsi pada inti flavonoid. Tambahan dari masing-masing reagen ini secara terpisah ke pelarut alkohol dari flavonoid menginduksi perubahan struktural yang signifikan dalam

spektrum UV. Pergeseran jenis ini umumnya disebabkan oleh penambahan natrium metoksida (NaOMe), natrium asetat (NaOAc), aluminium klorida (AlCl_3).

BAB 5

Potensi Antimikrobia

5.1. Bakteri

5.1.1 Pengertian Bakteri

Bakteri merupakan mikroorganisme yang bersifat uniseluler, termasuk kelas Schizomycetes. Pada umumnya bakteri tidak mempunyai klorofil dan reproduksinya secara aseksual secara pembelahan transversal atau biner. Sifat-sifat bakteri yang penting adalah bersifat saprofit atau parasit, patogen terhadap manusia dan hewan atau tumbuhan. Berdasarkan atas bentuknya dapat dibedakan menjadi tiga bentuk umum, yaitu bentuk bulat, batang, dan melengkung.

5.1.2 Morfologi Bakteri

Bakteri mempunyai bentuk dan ukuran yang sangat beragam. Sebagian besar sel bakteri memiliki diameter 0,2-2 mikron dan panjang 2-8 mikron. Berdasarkan bentuk bakteri digolongkan menjadi tiga golongan utama, yaitu bentuk kokus (bulat), bentuk basil (batang), dan bentuk spiral.

Biasanya sel bakteri yang muda berukuran jauh lebih besar dari pada sel yang tua. Bentuk dan ukuran suatu bakteri dapat dipengaruhi oleh faktor lingkungan seperti temperatur inkubasi, umur kultur, dan komposisi media pertumbuhan. Berdasarkan

bentuk morfologi, ada beberapa bentuk dasar bakteri, yaitu bulat (tunggal: *coccus*, jamak: *cocci*), batang atau silinder (tunggal: *bacillus*, jamak: *bacilli*), dan spiral yaitu berbentuk batang melengkung atau melingkar-lingkar.

Bakteri kokus biasanya berbentuk bulat atau lonjong, hidup sendiri-sendiri berpasangan, membentuk rantai panjang atau kubus tergantung cara bakteri itu membelah diri dan kemudian melekat satu sama lain saat pembelahan. Kokus yang tetap berpasangan membelah disebut dengan diplokokus (*diplococcus*). Streptokokus (*streptococcus*) adalah kokus yang membelah dalam satu bidang dan tidak memisahkan diri sehingga berbentuk rantai. Kokus yang membelah dalam tiga bidang yang saling tegak lurus sehingga membentuk kubus adalah *Sarcinae*, sedangkan kokus yang membelah membentuk gugusan atau berkelompok seperti buah anggur adalah bakteri *Staphylococcus*. Bentuk morfologi kokus berbeda beda seringkali digunakan untuk mengidentifikasi jenis bakteri golongan kokus.

Bakteri basil adalah golongan bakteri yang memiliki bentuk seperti batang atau silinder. Bakteri ini mempunyai ukuran yang sangat beragam. Basil umumnya terlihat sebagai batang tunggal. Beberapa bakteri basil berpasangan setelah pembelahan sel.

Bentuk basil terdiri atas diplobasilus (*diplobacillus*), streptobasilus (*streptobacillus*), dan kokobasilus (*cocobacillus*).

Bakteri spiral adalah bakteri yang mempunyai bentuk yang tidak lurus seperti basil tetapi mempunyai satu atau beberapa lekukan. Bakteri spiral dibagi menjadi (*i*) *vibrio*, yaitu bakteri yang berbentuk tabung yang melengkung menyerupai bentuk koma, (*ii*) *spirillum*, yaitu bakteri yang berbentuk spiral atau pilihan dengan selnya yang kokoh, dan (*iii*) *spiroketa*, yaitu bakteri yang berbentuk spiral dan tubuhnya sangat lentur sehingga dapat bergerak bebas. Kemampuan bergerak ini dimungkinkan karena adanya kontraksi yang lentur dari sumbu filamen atau flagel yang terdapat di permukaan dinding sel bakteri.

5.1.3 Struktur Bakteri

Struktur bakteri terbagi menjadi dua, yaitu:

- 1) Struktur dasar (dimiliki oleh hampir semua jenis bakteri) meliputi:
 - a. Dinding sel tersusun dari peptidoglikan yaitu gabungan protein dan polisakarida (ketebalan peptidoglikan membagi bakteri menjadi bakteri gram positif bila peptidoglikannya tebal dan bakteri gram negatif bila peptidoglikannya tipis).
 - b. Membran plasma adalah membran yang menyelubungi sitoplasma tersusun atau lapisan fosfolipid dan protein.
 - c. Sitoplasma adalah cairan sel.

- d. Ribosom adalah organel yang tersebar dalam sitoplasma, tersusun atas protein dan RNA.
- e. Granula penyimpanan, karena bakteri menyimpan cadangan makanan yang dibutuhkan) Struktur tambahan (dimiliki oleh jenis bakteri tertentu) meliputi: kapsul, flagellum, pilus, fimbris, klorosom, vakuola gas dan endospora.

5.1.4 Klasifikasi Bakteri Berdasarkan Pewarnaan

Bakteri hidup tersebar di alam, antara lain di tanah, udara, air, dan makanan. Secara garis besar bakteri dapat dibedakan atas bakteri Gram positif dan Gram negatif.

- a) Bakteri Gram Negatif memiliki dinding sel yang terdiri atas membran sel, lapisan peptidoglikon dan membran luar. Pada pengecatan bakteri Gram negatif warna cat yang pertama (Gram A) dilunturkan karena tidak tahan terhadap alkohol dan mengikat warna yang kedua (warna kontras) sehingga bakteri berwarna merah. Warna tersebut merupakan warna safranin yang mewarnai membran luar. Contoh bakteri Gram negatif yaitu *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Branhamella catanhalis*, *Escherichia coli*, *Salmonella tyhposa* dan lain-lain.
- b) Bakteri Gram Positif memiliki sel yang terdiri atas membran sel dan berlapis-lapis peptidoglikon. Pada pengecatan bakteri gram

positif tetap mengikat warna cat pertama (Gram A) karena tahan terhadap alkohol dan tidak mengikat warna cat kedua (warna kontras) sehingga bakteri berwarna ungu yang mewarnai peptidoglikon. Contoh bakteri Gram Positif yaitu *Staphylococcus pneumoniae*, *Bacillus anthracis*, *Staphylococcus aureus* dan lain-lain.

5.1.5 Fase Pertumbuhan Bakteri

Ada empat macam fase pertumbuhan bakteri, yaitu:

- a. Fase Lag, merupakan fase adaptasi yaitu fase penyesuaian bakteri pada suatu lingkungan baru. Ciri fase lag adalah tidak adanya peningkatan jumlah sel yang ada hanyalah peningkatan jumlah ukuran sel. Fase lag tergantung pada kondisi dan jumlah awal bakteri dan media pertumbuhan.
- b. Fase log (fase eksponensial), fase dimana bakteri tumbuh dan membelah pada kecepatan maksimum tergantung pada genetika mikroorganisme, sifat media dan kondisi pertumbuhan.
- c. Fase stasioner, pertumbuhan bakteri berhenti dan terjadi keseimbangan antara jumlah sel yang mati. Pada fase ini terjadi akumulasi produk buangan yang toksik. Pada sebagian besar kasus pergantian sel terjadi dalam fase ini.

d. Fase kematian, jumlah sel yang mati meningkat. Faktor penyebabnya adalah ketidakterersediaan nutrisi dan akumulasi produk buangan yang toksik.

5.1.6 Faktor-faktor yang Mempengaruhi Pertumbuhan Bakteri

Pertumbuhan pada bakteri mempunyai arti perbanyakan sel dan peningkatan ukuran populasi. Faktor-faktor yang mempengaruhi pertumbuhan bakteri atau kondisi untuk pertumbuhan optimum adalah:

a. Bahan dasar

- 1) Air (H_2O) sebagai pelarut
- 2) Agar (dari rumput laut) yang berfungsi untuk pematat media. Agar sulit di degradasi oleh mikroorganismenya pada umumnya dan mencair pada suhu $45^{\circ}C$.
- 3) Gelatin juga memiliki fungsi yang sama seperti agar. Gelatin adalah polimer asam amino yang diproduksi dari kolagen. Kekurangannya adalah lebih banyak jenis mikroba yang mampu menguraikannya dibanding agar.
- 4) *Silica gel*, yaitu bahan yang mengandung natrium silikat. Fungsinya juga sebagai pematat media. Silica gel khusus digunakan untuk memadatkan media bagi mikroorganismenya autotrof obligat.

b. Nutrisi atau Zat Makanan

Media harus mengandung unsur-unsur yang diperlukan untuk metabolisme sel yaitu berupa unsur makro seperti C, H, O, N, P, unsur mikro seperti Fe, Mg dan unsur pelikan.

- 1) Sumber karbon dan energi yang dapat diperoleh berupa senyawa organik atau anorganik sesuai dengan sifat mikroanya. Jasad heterotrof memerlukan sumber karbon organik antara lain dari karbohidrat, lemak, protein dan asam organik.
- 2) Sumber nitrogen mencakup asam amino, protein atau senyawa bernitrogen lain. Sejumlah mikroba dapat menggunakan sumber anorganik seperti urea.
- 3) Vitamin-vitamin.

c. Bahan Tambahan

Bahan-bahan tambahan yaitu bahan yang ditambahkan ke medium dengan tujuan tertentu, misalnya *phenolred* (indikator asam basa) ditambahkan untuk indikator perubahan pH akibat produksi asam organik hasil metabolisme. Antibiotik ditambahkan untuk menghambat pertumbuhan mikroba non-target/ kontaminan.

d. Bahan yang sering Digunakan dalam Pembuatan Media

- 1) Agar, agar dapat diperoleh dalam bentuk batangan, granula atau bubuk dan terbuat dari beberapa jenis rumput laut. Kegunaannya

adalah sebagai pematat (*gelling*) yang pertama kali digunakan oleh Fraw & Walther Hesse untuk membuat media. Jika dicampur dengan air dingin, agar tidak akan larut. Untuk melarutkannya harus diaduk dan dipanasi, pencairan dan pematatan berkali-kali atau sterilisasi yang terlalu lama dapat menurunkan kekuatan agar, terutama pada pH yang asam.

- 2) *Peptone*. *Peptone* adalah produk hidrolisis protein hewani atau nabati seperti otot, liver, darah, susu, casein, lactalbumin, gelatin dan kedelai. Komposisinya tergantung pada bahan asalnya dan bagaimana cara memperolehnya.
- 3) *Meat extract*. *Meat extract* mengandung basa organik terbuat dari otak, limpa, plasenta dan daging sapi.
- 4) *Yeast extract*. *Yeast extract* terbuat dari ragi pengembang roti atau pembuat alkohol. *Yeast extract* mengandung asam amino yang lengkap & vitamin (*B complex*).
- 5) Karbohidrat. Karbohidrat ditambahkan untuk memperkaya pembentukan asam amino dan gas dari karbohidrat. Jenis karbohidrat yang umumnya digunakan dalam amilum, glukosa, fruktosa, galaktosa, sukrosa, manitol dan lain-lain. Konsentrasi yang ditambahkan untuk analisis fermentasi adalah 0,5-1%.

5.1.7 Cara Perkembangbiakan Bakteri

Bakteri umumnya melakukan reproduksi atau berkembang biak secara aseksual (tak kawin) dengan membelah diri. Pembelahan sel pada bakteri adalah pembelahan biner yaitu setiap sel membelah menjadi dua. Reproduksi bakteri secara seksual yaitu dengan pertukaran materi genetik dengan bakteri lainnya. Pertukaran materi genetik disebut rekombinasi genetik atau rekombinasi DNA. Rekombinasi genetik dapat dilakukan dengan tiga cara yaitu:

1. Transformasi adalah pemindahan sedikit materi genetik, bahkan satu gen saja dari satu sel bakteri ke sel bakteri yang lainnya.
2. Transduksi adalah pemindahan materi genetik satu sel bakteri ke sel bakteri lainnya dengan perantara organisme yang lain yaitu bakteriofage (virus bakteri).
3. Konjugasi adalah pemindahan materi genetik berupa plasmid secara langsung melalui kontak sel dengan membentuk struktur seperti jembatan di antara dua sel bakteri yang berdekatan. Umumnya terjadi pada bakteri Gram negatif.

5.1.8 Bakteri *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus merupakan bakteri Gram positif berbentuk bulat berdiameter 0,7-1,2 μm , tersusun dalam kelompok-kelompok yang tidak teratur seperti buah anggur, fakultatif anaerob,

tidak membentuk spora, dan tidak bergerak. Bakteri ini tumbuh pada suhu optimum 37°C, tetapi membentuk pigmen paling baik pada suhu kamar (20-25°C). Koloni pada perbenihan padat berwarna abu-abu sampai kuning keemasan, berbentuk bundar, halus, menonjol dan berkilau. Lebih dari 90% isolate klinik menghasilkan *S. aureus* yang mempunyai kapsul polisakarida atau selaput tipis yang berperan dalam virulensi bakteri.

Sebagian bakteri *Staphylococcus* merupakan flora normal pada kulit, saluran pernafasan dan saluran pencernaan makanan pada manusia. Bakteri ini juga ditemukan di udara dan lingkungan sekitar. *S. aureus* yang pathogen bersifat invasive, menyebabkan hemolisis, membentuk koagulasi dan mampu meragikan manitol. Infeksi oleh *S. aureus* ditandai dengan kerusakan jaringan yang disertai abses bernanah.

Klasifikasi *Staphylococcus aureus* menurut Bergey (1994) adalah sebagai berikut:

Kingdom : Monera
divisi : Firmicutes
kelas : Bacilli
ordo : Bacilalles
family : Staphylocacae

genus : Staphylococcus

spesies : *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus biasanya peka terhadap antibiotik beta-laktam dan makrolida, tetrasiklin, novobiosin dan kloramfenikol, tetapi resisten terhadap polimixin.

5.1.9 Bakteri *Salmonella typhi*

Salmonella typhi merupakan bakteri batang Gram negatif dan tidak membentuk spora, serta memiliki kapsul. Bakteri ini juga bersifat fakultatif, dan sering disebut sebagai *facultative intracellular parasites*. Dinding selnya terdiri atas murein, lipoprotein, fosfolipid, protein, dan lipopolisakarida (LPS) dan tersusun sebagai lapisan-lapisan. Ukuran panjangnya bervariasi dan sebagian besar memiliki *peritrichous flagella* sehingga bersifat motil. *Salmonella typhi* membentuk asam dan gas dari glukosa dan *mannosa*. Bakteri ini tahan hidup dalam air yang membeku untuk waktu yang lama.

Klasifikasi *Salmonella typhi* adalah sebagai berikut:

Phylum : Eubacteria

Class : Proteobacteria

Ordo : Eubacteriales

Family : Enterobacteriaceae

Genus : Salmonella

Species : *Salmonellaenterica*

Subspesies : *enteric*

Serotipe : *typhi*

Demam tifoid merupakan penyakit sistematik yang ditandai dengan demam dan nyeri abdomen dan muncul akibat infeksi *Salmonella typhi* dan *Salmonella paratyphi*. Masa inkubasi *Salmonella typhi* berkisar 3-21 hari, gejala klinis yang umum adalah demam yang panjang (38,8° sampai 40,5°C). Demam ini dapat berkelanjutan selama 4 minggu jika tidak segera ditangani.

Pada minggu pertama, keluhan yang dapat muncul sangat umum, seperti demam, nyeri kepala, pusing, nyeri otot, anoreksia, mual, muntah, obstipasi atau diare, perasaan tidak enak pada perut, batuk dan epistaksis. Jika dilakukan pemeriksaan fisik, hanya dapat ditemukan suhu tubuh yang meningkat. Pada minggu kedua gejala mulai lebih menonjol, yakni demam, bradikardi relatif, lidah yang berselaput, hepatomegali, spleno *megali*, meteorismus, gangguan mental berupa *somnolen*, *stupor*, koma, *delirium* atau *psikosis*.

5.2. Antibakteri

5.2.1 Pengertian Antibakteri

Antibakteri adalah zat yang menghambat pertumbuhan bakteri dan digunakan secara khusus untuk mengobati infeksi. Mekanisme kerja antibakteri dapat terjadi melalui beberapa cara

yaitu kerusakan pada dinding sel, perubahan permeabilitas sel, dan menghambat sintesis protein dan asam nukleat. Banyak faktor dan keadaan yang dapat mempengaruhi kerja antibakteri, antara lain konsentrasi antibakteri, jumlah bakteri, spesies bakteri, adanya bahan organik, suhu, dan pH lingkungan.

Senyawa antibakteri terdiri atas beberapa kelompok berdasarkan mekanisme daya kerjanya atau tujuan kegunaannya. Bahan antibakteri dapat secara fisik atau kimia dan berdasarkan peruntukannya dapat berupa desinfektan, antiseptik, sterilizer, sanitizer dan sebagainya. Bahan kimia yang digunakan dalam pengobatan (kemoterapeutik) menjadi pilihan bila dapat mematikan bakteri disebut bakterisidal, sedangkan bahan kimia yang menghambat pertumbuhan disebut bakteristatik. Bahan antimikrobia dapat bersifat bakteristatik pada konsentrasi rendah, namun bersifat bakterisidal pada konsentrasi tinggi.

Aktivitas antibakteri suatu senyawa kimia suatu senyawa kimia ditentukan oleh konsentrasi dan sifat dari bahan yang digunakan. Umumnya hampir semua senyawa kimia pada konsentrasi yang sangat tinggi dapat bersifat racun. Mekanisme daya kerja antimikroba terhadap sel dapat dibedakan atas beberapa kelompok sebagai berikut:

1. Merusak dinding sel
2. Mengganggu permeabilitas sel
3. Merusak molekul protein dan asam nukleat
4. Menghambat aktivitas enzim
5. Menghambat sintesa asam nukleat

Aktivitas antibakteri yang dapat diamati secara langsung adalah perkembangbiakannya. Oleh karena itu bakteri disebut mati jika tidak dapat berkembang biak.

5.2.2 Mekanisme Aksi Antibakteri

Kadar mineral yang diperlukan untuk menghambat pertumbuhan mikroba atau membunuhnya masing-masing dikenal sebagai kadar hambat minimal (KHM) dan kadar bunuh minimal (KBM). Mekanisme penghambatan mikroorganisme oleh senyawa antimikroba dapat disebabkan oleh beberapa faktor, antara lain: gangguan pada senyawa penyusun dinding sel, peningkatan permeabilitas membran sel yang dapat menyebabkan kehilangan komponen penyusun sel, menginaktivasi enzim, dan destruksi atau kerusakan fungsi material genetik. Kemampuan senyawa antimikroba untuk menghambat aktivitas pertumbuhan mikroba dalam sistem pangan dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor

diantaranya temperatur, pH (keasaman), ketersediaan oksigen, dan interaksi atau sinergi antara beberapa faktor tersebut.

5.3. Uji Antibakteri Ekstrak Kalus Tanaman Sarang Semut

Di Kalimantan, jenis tumbuhan Sarang semut (*Myrmecodia tuberosa* Jack) banyak sekali ditemukan di daerah pedalaman Kabupaten Bulungan yang biasanya digunakan masyarakat setempat sebagai obat tradisional, diantaranya untuk menghilangkan pegal linu, sakit kepala, asam urat, diare, kolesterol, maag dan kanker. Dalam uji *in vitro*, terbukti bahwa sarang semut ampuh menghambat pertumbuhan sel kanker seperti kanker serviks, kanker paru dan kanker usus, sel kanker servik dan payudara (HeLa dan MCM-B2 cells) (Soeksmanto dkk., 2010), sel kanker mulut (sel B88) (Supriatno, 2014) dan juga berfungsi sebagai antioksidan dan antimikroba (Prachayasittikul dkk., 2008).

Khasiat sarang semut sebagai tanaman obat mengakibatkan banyak orang yang mencari tumbuhan sarang semut di alam, sehingga kontinuitas keberadaan tumbuhan tersebut menjadi terancam. Selain itu, bagian tumbuhan sarang semut yang banyak digunakan untuk pengobatan oleh masyarakat adalah bagian umbinya. Penggunaan umbi sebagai bahan obat tradisional dapat mematikan tanaman sarang semut karena tumbuhan sarang semut tidak dapat berkembang biak. Oleh sebab itu perlu dilakukan

usaha pelestarian melalui mekanisme pemuliaan dan pembudidayaan.

Salah satu usaha pelestarian tanaman yang dapat digunakan untuk mempelajari sintesis metabolit sekunder secara kultur jaringan adalah kultur kalus. Uji yang dilakukan untuk membuktikan hal tersebut salah satunya dengan melakukan uji aktivitas antibakteri pada ekstrak kalus tumbuhan sarang semut.

Uji aktivitas antibakteri dilakukan untuk mengetahui kadar terkecil suatu obat atau zat yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri secara *in vitro*. Penelitian dilakukan secara *in vitro* agar dapat ditentukan potensi zat antibakteri, konsentrasi, dan kepekaan bakteri terhadap konsentrasi zat-zat tertentu. Uji kepekaan ini dapat dikerjakan dengan menggunakan metode dilusi maupun metode difusi. Pengukuran zat antibakteri dalam menghambat dan membunuh pertumbuhan bakteri secara *in vitro*, dapat dilakukan dengan dua cara yaitu metode difusi dan dilusi.

5.3.1 Metode Difusi

Adalah metode yang menggunakan antimikroba dengan kadar yang menurun secara bertahap, baik dengan media cair atau padat yang kemudian media diinokulasi bakteri uji dan di inkubasi. Tahap akhir dilarutkan antimikroba dengan kadar yang menghambat atau mematikan. Metode difusi yang biasa digunakan

adalah metode *disc diffusion* (Uji Kirby & Baur). Metode ini untuk menentukan aktivitas agen antimikroba. Piringan yang berisi agen antimikroba diletakkan pada media agar yang telah ditanami mikroorganisme yang akan berdifusi pada media agar tersebut. Area jernih mengindikasikan adanya hambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh agen antimikroba pada permukaan media agar. Metode ini dipengaruhi banyak faktor disamping interaksi antara obat dan bakteri (misalnya sifat perbenihan, daya difusi, ukuran molekul dan stabilitas obat). Kelemahan metode difusi adalah metode ini tidak dapat menentukan apakah suatu obat bersifat bakterisida dan bakteristatik. Akan tetapi, metode difusi relatif sederhana, tidak mahal dan sering digunakan bila fasilitas laboratorium yang memadai tidak tersedia. Prinsip kerja dari metode ini sangat sederhana, yaitu ketika kertas cakram yang berisi sejumlah obat tertentu ditempatkan pada permukaan media padat yang sebelumnya telah diinokulasi bakteri uji pada permukaannya, obat tersebut akan berdifusi secara radial melalui agar, setelah di inkubasi dan bakteri tersebut tumbuh, maka akan terbentuk zona jernih sekitar cakram. Adanya zona jernih yang melingkar di sekitar cakram menunjukkan agen obat menghambat pertumbuhan bakteri resisten terhadap obat tersebut.

5.3.2 Metode Dilusi

Dibedakan menjadi dua, yaitu dilusi cair (*broth dilution*) dan dilusi padat (*solid dilution*).

a. Metode Dilusi Cair

Adalah metode yang mengukur MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) atau KMH (Kadar Hambat Minum) dan MBC (*Minimum Bactericidal Concentration*) atau KBM (Kadar Bunuh Minum). Cara yang dilakukan adalah dengan cara membuat seri pengenceran agen antimikroba pada medium cair yang ditambahkan dengan mikroba uji. Larutan uji agen antimikroba pada kadar terkecil yang terlihat jernih tanpa adanya pertumbuhan mikroba uji ditetapkan sebagai KMH. Larutan yang ditetapkan KMH tersebut selanjutnya diukur ulang pada media cair tanpa penambahan mikroba uji ataupun agen antimikroba, dan diinkubasi selama 18-24 jam. Media cair yang tetap terlihat jernih setelah diinkubasi ditetapkan sebagai KBM.

b. Metode Dilusi Padat

Serupa dengan metode dilusi cair, namun menggunakan media padat keuntungan metode ini adalah satu konsentrasi agen antimikroba yang di uji dapat digunakan untuk menguji beberapa mikroba uji.

5.4. Daya Hambat

Sensitifitas menyatakan bahwa uji sensitifitas bakteri merupakan suatu metode untuk menentukan tingkat kerentanan bakteri terhadap zat antibakteri dan untuk mengetahui senyawa murni yang memiliki aktivitas antibakteri. Metode uji sensitifitas bakteri adalah metode cara bagaimana mengetahui dan mendapatkan produk alam yang berpotensi sebagai bahan antibakteri serta mempunyai kemampuan untuk menghambat pertumbuhan atau mematikan bakteri pada konsentrasi rendah. Seorang ilmuwan dari perancis bahwa metode difusi agar dari prosedur Kirby-Bauer, sering digunakan untuk mengetahui sensitifitas bakteri. Prinsip dari metode ini adalah penghambatan terhadap pertumbuhan mikroorganisme, yaitu zona hambatan yang terlihat sebagai daerah jernih disekitar cakram kertas. Zona hambat merupakan tempat dimana bakteri terhambat pertumbuhannya akibat antibakteri atau antimikroba.

5.4.1 Uji Kematian Larva Udang (*Brine Shrimp Lethality Test*) (BSLT) Ekstrak Kalus Sarang Semut

Sebelum penggunaannya sebagai bahan obat, perlu diuji terlebih dahulu apakah ekstrak etanol kalus sarang semut memiliki sifat antibakteri. Aktivitas antibakteri juga erat kaitannya dengan toksisitas tanaman dan diketahui toksisitas tanaman erat kaitannya

dengan senyawa-senyawa metabolit sekunder yang ada di dalamnya (Lisdawati dkk, 2006).

Salah satu metode awal yang sering digunakan untuk mengamati toksisitas senyawa dan merupakan metode penapisan untuk aktivitas antikanker senyawa kimia dalam ekstrak tumbuhan adalah *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) menggunakan larva udang *Artemia salina* Leach. Uji kematian larva udang merupakan uji pendahuluan untuk mengamati aktifitas farmakologi suatu senyawa. Larva udang *A. salina* Leach digunakan karena bersifat peka terhadap bahan uji karena keadaan mambran kulitnya yang sangat tipis sehingga memungkinkan terjadinya difusi zat dari lingkungan yang mempengaruhi metabolisme dalam tubuhnya (Meyer dkk,1982).

Uji bioaktivitas menggunakan larva udang *Artemia salina* Leach. dikenal dengan istilah *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). BSLT adalah suatu metode penelusuran untuk menentukan bioaktivitas suatu ekstrak ataupun senyawa terhadap larva udang dari *A. salina*. Metode ini berkembang sebagai salah satu metode *bioassay* dalam mengisolasi senyawa aktif yang terdapat dalam suatu ekstrak tanaman. Lebih jauh lagi *bioassay* ini sering dikaitkan sebagai metode identifikasi senyawa anti kanker berasal dari tumbuhan. Uji bioaktivitas dengan menggunakan larva udang

memiliki spektrum farmakologi yang luas, prosedurnya sederhana, cepat, tidak memerlukan biaya yang besar dan hasilnya dapat dipercaya.

Uji mortalitas larva udang merupakan salah satu metode uji bioaktif pada penelitian senyawa bahan alam dan sudah dilakukan sejak tahun 1956. Sejak saat itu telah banyak dilakukan pada studi lingkungan, toksisitas dan penapisan senyawa bioaktif dari jaringan tanaman. Uji ini merupakan uji pendahuluan untuk mengamati aktivitas farmakologi suatu senyawa. Adapun penerapan untuk sistem bioaktivitas dengan menggunakan larva udang tersebut, antara lain untuk mengetahui residu pestisida, anestetik lokal, senyawa turunan morpin, mikotoksin, karsinogenitas suatu senyawa dan polutan untuk air laut serta sebagai alternatif metode yang murah untuk uji sitotoksitas (Hamburger dan Hostettmann, 1991). Maksud utama uji toksisitas ialah menguji keamanan obat. Penafsiran keamanan obat untuk manusia dapat dilakukan melalui serangkaian percobaan toksisitas terhadap hewan uji. Senyawa aktif yang memiliki daya bioaktivitas tinggi diketahui berdasarkan nilai *Lethal Concentration 50%* (LC_{50}), yaitu suatu nilai yang menunjukkan konsentrasi zat toksik yang dapat menyebabkan kematian hewan uji sampai 50%. Data mortalitas yang diperoleh kemudian diolah dengan probit analisis untuk menentukan nilai

LC₅₀ pada derajat kepercayaan 95%. Senyawa kimia berpotensi bioaktif jika mempunyai nilai LC₅₀ kurang dari 1.000 ppm (Meyer dkk, 1982)

Udang renek asin (*brine shrimp*) atau artemia adalah udang-udangan tingkat rendah yang hidup sebagai zooplankton yang menghuni perairan-perairan yang berkadar garam tinggi (salina), baik dekat pantai maupun jauh di pedalaman laut.

A. salina Leach. diklasifikasikan sebagai berikut:

kingdom : Animalia
filum : Arthropoda
kelas : Crustacea
subklas : Branchipoda
ordo : Anostraca
famili : Artemiidae
genus : Artemia
spesies : *A. salina* Leach

Keunggulan penggunaan *A. salina* untuk uji BSLT ini ialah sifatnya yang peka terhadap bahan uji, waktu siklus hidup yang lebih cepat, mudah dibiakkan dan harganya yang murah. Sifat peka *A. salina* kemungkinan disebabkan oleh keadaan membran kulitnya

yang sangat tipis sehingga memungkinkan terjadinya difusi zat dari lingkungan yang mempengaruhi metabolisme dalam tubuhnya.

Uji BSLT dengan menggunakan *A. salina* dilakukan dengan menetas telur-telur tersebut dalam air laut yang dibantu dengan aerasi. Telur *A. salina* akan menetas sempurna menjadi larva dalam waktu 24 jam. *A. salina* yang baik digunakan untuk uji BSLT ialah yang berumur 48 jam sebab jika lebih dari 48 jam dikhawatirkan kematian *A. salina* bukan disebabkan toksisitas ekstrak melainkan oleh terbatasnya persediaan makanan (Meyer dkk, 1982).

Larva yang baru saja menetas berbentuk bulat lonjong dan berwarna kemerah-merahan dengan panjang 400 µm dengan berat 15 µg. Anggota badannya terdiri dari sepasang sungut kecil (anteluena atau antena I) dan sepasang sungut besar (antena atau antena II). Di bagian depan diantara kedua sungut kecil tersebut terdapat bintik merah yang berfungsi sebagai mata (oselus). Di belakang sungut besarnya terdapat sepasang mandibula (rahang) yang kecil, sedangkan di bagian perut (ventral) sebelah depan terdapat labrum.

Hasil uji toksisitas dengan menggunakan metode BSLT disajikan dalam Tabel 6 sebagai berikut:

Tabel 6. Nilai LC₅₀ (ppm) Ekstrak Etanol Kalus Sarang Semut (*M. tuberosa* Jack.) terhadap *A. salina* Leach. menggunakan pelarut air laut.

Konsentrasi (ppm)	Rata-rata <i>A. salina</i> yang mati	Rata-rata <i>A. salina</i> yang hidup	Persentase Kematian	LC ₅₀ (ppm)
1000	11	19	36.6	1.316,46
500	6	24	20	
250	2	28	6.6	
125	0	30	0	
62.5	0	30	0	
31.2	0	30	0	
15.6	0	30	0	
7.8	0	30	0	

Untuk mengetahui bioaktivitas ekstrak etanol kalus sarang semut (*M. tuberosa* Jack.) maka dilakukan uji mortalitas terhadap larva udang (*A. salina* Leach.) dengan menggunakan BSLT (*brine shrimp lethality test*). Menurut Mc Laughlin (1998), pengamatan potensi bioaktivitas ini dilakukan berdasarkan nilai *Lethal Concentration* 50% (LC₅₀) yaitu suatu nilai yang menunjukkan konsentrasi zat toksik yang dapat mengakibatkan kematian organisme sampai 50%. Senyawa kimia dikatakan berpotensi aktif atau toksik bila mempunyai LC₅₀ kurang dari 1000 ppm dan dikatakan kurang aktif atau tidak toksik bila mempunyai LC₅₀ lebih dari 1000 ppm.

Berdasarkan hasil uji mortalitas larva udang dari ekstrak etanol kalus sarang semut diperoleh nilai LC_{50} 1.316,46 ppm (Tabel 6). Nilai LC_{50} dari uji mortalitas larva udang diperoleh dengan menggunakan Analisis Probit. Berdasarkan data tersebut diketahui bahwa ekstrak etanol tersebut kurang aktif atau lemah karena LC_{50} yang diperoleh lebih besar dari 1000 ppm, tetapi sangat baik digunakan sebagai antioksidan. Senyawa fenolik pada tumbuhan mampu memberikan efek menguntungkan bagi kesehatan tubuh, terutama pada penyakit jantung koroner dan kanker, terutama karena memiliki aktivitas antioksidan. Kandungan senyawa flavonoid pada tumbuhan juga berperan sebagai antioksidan dalam tubuh manusia, sehingga sangat baik untuk pencegahan kanker, melindungi struktur sel dan memiliki hubungan sinergis dengan vitamin C (meningkatkan efektivitas vitamin C).

5.4.2 Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Kalus Sarang Semut

Metode yang digunakan untuk mengetahui adanya kandungan senyawa anti bakteri ekstrak etanol kalus tumbuhan sarang semut adalah *disc diffusion* (Uji Kirby & Baur), dilakukan terhadap *Staphylococcus aureus* yang mewakili bakteri Gram positif dan *Salmonella typhi* yang mewakili bakteri Gram negatif.

Staphylococcus aureus merupakan bakteri penyebab keracunan yang memproduksi eteroksin. Bakteri ini sering ditemukan pada makanan-makanan yang mengandung protein tinggi, misalnya sosis, telur dan sebagainya. Memakan makanan yang dicemari oleh racun-racun *S. aureus* mengakibatkan penyakit usus yang menyebabkan mual, muntah, diare dan dehidrasi (Stainer, 1987). Sebagian besar *Salmonella typhi* bersifat patogen pada binatang dan merupakan sumber infeksi bagi manusia yang demam tifoid atau sering dikenal dengan nama tifosa. Rata-rata diameter zona bening yang terbentuk dari perlakuan yang dihasilkan dapat dilihat pada Tabel 7 sebagai berikut:

Tabel 7. Rata-Rata Diameter Zona Bening Perlakuan Ekstrak Etanol Kalus Sarang Semut (*Myrmecodia tuberosa* Jack) terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella typhi*

Bakteri Uji	Rata-rata Diameter Zona Hambat (mm)					
	Perlakuan					
	Kontrol (-)	34.64%	39.97%	46.13%	53.23%	Kontrol (+)
<i>S. aureus</i>	0 ^a	13.93 ^b	14.43 ^{bc}	15.33 ^{cd}	15.75 ^d	18.96 ^e
<i>S. typhi</i>	0 ^a	13.30 ^b	14.78 ^{bc}	15.95 ^c	16.05 ^c	15.86 ^c

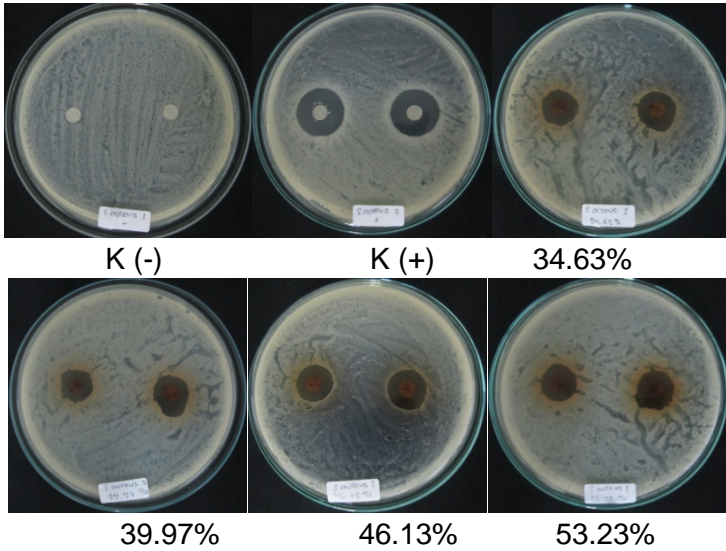
Keterangan: Notasi huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan nilai rata-rata berbeda nyata pada uji DMRT dengan taraf kepercayaan 95%.

Hasil pengujian aktivitas antibakteri ekstrak kalus sarang semut (*M. tuberosa* Jack.) terhadap bakteri *S. aureus* (Gambar 20) dan *S. typhi* (Gambar 21) menunjukkan adanya daerah hambatan pada pertumbuhan bakteri. Daerah hambatan pertumbuhan bakteri

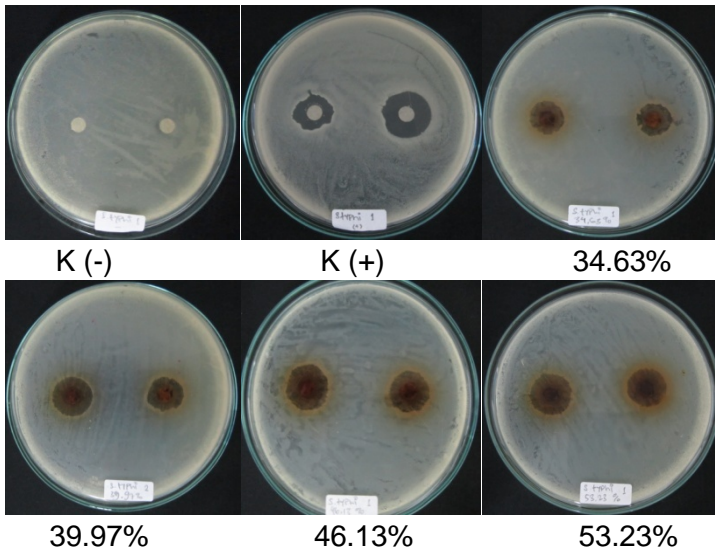
ditunjukkan dengan adanya zona bening yang terdapat disekeliling kertas cakram. Pengukuran zona hambatan dilakukan dengan mengukur diameter daerah jernih.

Dari Tabel 7 dapat diketahui bahwa rata-rata diameter zona hambat paling tinggi yang terbentuk pada bakteri *S. aureus* terdapat pada konsentrasi 53.23% yaitu 15.75 mm dan zona hambat yang terbentuk paling rendah terdapat pada konsentrasi 34.64% yaitu 13.93 mm. Pada bakteri *S. typhi*, zona hambat yang terbentuk paling tinggi terdapat pada konsentrasi 53.23% yaitu 16.05 mm dan zona hambat yang terbentuk paling rendah terdapat pada konsentrasi 34.64% yaitu 13.30 mm. Ini berarti semakin tinggi konsentrasi semakin besar zona hambat yang terbentuk, hal ini diduga karena kandungan senyawa-senyawa aktif dari Ekstrak etanol kalus sarang semut yang bersifat antibakteri (flavonoid). Menurut Robinson (1995), fungsi flavonoid bagi tumbuhan adalah untuk mengatur pertumbuhan dan berfungsi sebagai antimikroba dan antivirus.

Gambaran zona hambat pengaruh ekstrak etanol kalus sarang semut (*M. tuberosa* Jack.) terhadap *S. aureus* dan *S. typhi* dapat dilihat pada Gambar 20 dan Gambar 21 berikut ini:



Gambar 20. Zona Hambat Pengaruh Ekstrak Kalus Sarang Semut (*M. tuberosa* Jack.) terhadap bakteri *S. aureus*



Gambar 21. Zona Hambat Pengaruh Ekstrak Kalus Sarang Semut (*M. tuberosa* Jack.) terhadap bakteri *S. Typhi*

Dalam pengujian aktivitas antibakteri digunakan akuades sebagai kontrol negatif dan kloramfenikol sebagai standar (kontrol

positif). Penggunaan akuades disini juga sebagai pelarut untuk membuat variasi konsentrasi pada uji aktivitas antibakteri, alasan digunakan pelarut ini adalah agar daya hambat pertumbuhan bakteri yang dihasilkan tidak terpengaruh oleh pelarut. Dari hasil uji (Tabel 7) menunjukkan bahwa akuades yang digunakan sebagai kontrol negatif, tidak memiliki sifat sebagai antibakteri terhadap kedua jenis bakteri uji yang digunakan karena tidak terbentuk zona bening disekitar kertas cakram, maka zona hambat atau zona bening yang terbentuk dengan variasi konsentrasi murni dari ekstrak uji, tidak dipengaruhi oleh pelarut.

Kontrol positif yang digunakan adalah antibiotik kloramfenikol sebagai pembanding, rata-rata zona hambat yang terbentuk pada bakteri *S. aureus* sebesar 18.96 mm lebih besar dari zona hambat yang terbentuk pada konsentrasi 53.23%, menunjukkan bahwa kemampuan kloramfenikol dalam menghambat bakteri *S. aureus* lebih tinggi dari ekstrak etanol daun sarang semut (*M. tuberosa* Jack.) dan pada bakteri *S. typhi* rata-rata zona hambat yang terbentuk sebesar 15.86 mm lebih besar dari konsentrasi 39.97% dan lebih rendah dari konsentrasi 46.13%, menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun sarang semut (*M. tuberosa* Jack.) memiliki kemampuan menghambat bakteri *S. typhi* lebih tinggi dari kloramfenikol pada konsentrasi 46.13%.

Kloramfenikol merupakan jenis antibiotik yang memiliki spektrum kerja luas (dapat menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif dan Gram negatif). Kloramfenikol pada umumnya bersifat bakteriostatik (menghambat pertumbuhan bakteri) dan pada konsentrasi tinggi dapat bersifat bakterisidal (membunuh bakteri) pada mikroba tertentu.

BAB 6

Prospek Budidaya Sarang Semut Secara In Vitro

6.1. Kendala Budidaya Sarang Semut di Alam

Popularitas tumbuhan sarang semut yang melambung karena khasiatnya sebagai tumbuhan obat mengakibatkan banyak orang yang memburu tumbuhan sarang semut di alam, sehingga kontinuitas keberadaan tumbuhan tersebut di alam menjadi terancam. Pengambilan secara besar-besaran dari habitatnya di hutan-hutan Kalimantan tanpa upaya budidaya atau peremajaan serta pembalakan hutan secara liar mengakibatkan penurunan populasi tanaman sarang semut dan habitatnya menjadi rusak. Kejadian tersebut menyebabkan terjadinya erosi genetik dari tanaman sarang semut yang dapat menimbulkan kepunahan jika tidak dilakukan tindakan untuk menanggulunginya. Oleh sebab itu perlu dilakukan usaha pelestarian melalui mekanisme pemuliaan dan pembudidayaan.

Sampai saat ini belum ada upaya masyarakat untuk membudidayakan tanaman sarang semut. Hal ini disebabkan karena masyarakat lebih tertarik mengambil tanaman langsung ke hutan-hutan tanpa berniat untuk membudidayakannya. Selain itu faktor lingkungan sangat berperan penting terhadap pertumbuhan sarang semut. Kondisi lingkungan yang cenderung lembap adalah

kondisi yang optimal untuk perkecambahan biji. Jika kondisi lembap/musim hujan anakan tanaman sarang semut akan banyak dijumpai disekitar indukan. Tapi saat musim kemarau jarang ditemui anakan bahkan tanaman dewasa juga lambat tumbuh dan berbunga.

Oleh karena itu dibutuhkan suatu metode perbanyak tanaman untuk dapat mengatasi permasalahan tersebut. Salah satu metode yang dapat digunakan adalah teknik kultur jaringan (*in vitro*). Kultur jaringan adalah suatu metode untuk mengisolasi bagian dari tanaman seperti protoplasma, sel, jaringan dan organ, serta menumbuhkannya dalam kondisi aseptik, sehingga bagian-bagian tersebut dapat memperbanyak diri dan beregenerasi menjadi tumbuhan utuh kembali. Teknik kultur jaringan dapat menghasilkan tanaman sarang semut dalam jumlah yang banyak dan dalam waktu yang relatif singkat. Informasi tentang budi daya tanaman sarang semut dengan menggunakan metode kultur jaringan saat ini masih belum banyak dilaporkan. Oleh sebab itu peluang perbanyakkan tanaman ini dengan menggunakan metode tersebut masih sangat besar.

6.2. Teknik Kultur Jaringan

Kultur jaringan dalam bahasa asing disebut sebagai *tissue culture*, *weefsel cultuus* atau *gewebe kultur*. Kultur adalah budidaya dan jaringan adalah sekelompok sel yang mempunyai bentuk dan fungsi yang sama. Maka, kultur jaringan berarti membudidayakan suatu jaringan tumbuhan menjadi tumbuhan kecil yang mempunyai sifat seperti induknya.

Teknik kultur jaringan tumbuhan bermula dari pembuktian sifat totipotensi sel, yaitu bahwa setiap sel tumbuhan yang hidup dilengkapi dengan informasi genetik dan perangkat fisiologis yang lengkap untuk tumbuh dan berkembang menjadi tumbuhan utuh, jika kondisinya sesuai. Teknik kultur jaringan tumbuhan sangat potensial untuk program pemuliaan tumbuhan. Dibandingkan dengan memperbanyak tumbuhan secara konvensional, memperbanyak tumbuhan secara kultur jaringan mempunyai kelebihan yaitu dapat memperbanyak tumbuhan tertentu yang sulit atau sangat lambat diperbanyak secara konvensional, ditumbuhkan dalam waktu relatif singkat sehingga lebih ekonomis. Tujuan dari teknik ini adalah untuk memperbanyak tanaman dengan waktu yang lebih singkat. Teknik ini dicirikan oleh kondisi kultur yang aseptik (Gambar 22), penggunaan media kultur jaringan buatan dengan kandungan nutrisi lengkap dan zat pengatur tumbuh (ZPT), serta kondisi ruang kultur yang suhu dan pencahayaanya terkontrol.



(a)



(b)

Gambar 22. (a) Ruang Inkubasi Kultur Jaringan (b) *Laminar Air Flow*

Beberapa faktor yang mempengaruhi keberhasilan kultur jaringan adalah media tanam, zat pengatur tumbuh (zpt), sumber eksplan yang digunakan dan faktor lingkungan. ZPT merupakan senyawa organik bukan hara yang dalam konsentrasi rendah dapat menstimulir atau memacu pertumbuhan dan dalam konsentrasi tinggi dapat menghambat atau mengganggu proses fisiologis tumbuhan. Bila tidak ditambahkan ke dalam medium kultur jaringan pertumbuhan tumbuhan atau eksplan dapat terhambat, bahkan mungkin tidak tumbuh sama sekali.

Media kultur merupakan salah satu faktor penentu keberhasilan perbanyakan tumbuhan secara kultur jaringan. Berbagai komposisi media kultur telah diformulasikan untuk mengoptimalkan pertumbuhan dan perkembangan tumbuhan yang dikulturkan.

Media yang digunakan biasanya terdiri dari garam mineral, vitamin, dan hormon. Jenis dan formulasi media menentukan berhasil atau tidaknya perbanyakan sistem kultur jaringan. Komposisi media kultur harus mengandung unsur-unsur yang penting bagi pertumbuhan tanaman. Unsur-unsur tersebut adalah unsur makro dan unsur mikro (Gambar 23). Unsur makro yang dimaksud adalah: C, H, O, N, S, P, K, Ca, Mg dan unsur mikro adalah: Zn, Mn, Cu, Bo, Mo, Si, Al, Cl, Co, dan Fe. Unsur-unsur tersebut diberikan bukan dalam bentuk unsur murni tetapi dalam bentuk garam. Dimana sebelum digunakan garam-garam tersebut harus dicampur dengan aquadest.



Gambar 23. Bahan Kimia Pembuatan Media
(*sumber:*<https://www.google.co.id/search?=&source>)

Selain itu juga terdapat unsur lain yang tidak kalah pentingnya dalam kultur jaringan yaitu unsur mio-inositol, vitamin,

dan asam amino. Unsur mio-inositol pada medium berfungsi dalam membantu diferensiasi dan pertumbuhan jaringan, unsur vitamin berfungsi dalam merangsang pembelahan sel pada meristem dan unsur asam amino berperan dalam pertumbuhan dan diferensiasi kalus. Dan media tanam juga harus berisi semua zat yang dibutuhkan untuk pertumbuhan eksplan.

Beberapa macam media dasar yang pada umumnya diberi nama sesuai dengan nama penemunya, antara lain adalah :

1. Medium dasar *Murashige dan Skoog* (MS): Digunakan untuk hampir semua macam tumbuhan, terutama tumbuhan *herbaceous*. Media ini mempunyai konsentrasi garam-garam mineral yang tinggi dan senyawa N dalam bentuk NO_3^- dan NH_4^+ .
2. Medium dasar B5 atau Gamborg: Digunakan untuk kultur suspensi sel kedele, *alfafa* dan *legume* lain.
3. Medium dasar White: Digunakan untuk kultur akar. Medium ini merupakan medium dasar dengan konsentrasi garam-garam mineral yang rendah.
4. Medium *Vacint Went* (VW): Digunakan khusus untuk medium anggrek.
5. Medium dasar Nitsch: Digunakan untuk kultur tepung sari (*pollen*) dan kultur sel.

6. Medium dasar Schenk dan Hildebrandt: Digunakan untuk kultur jaringan tumbuhan monokotil.
7. Medium dasar *Woody Plant Medium* (WPM): Digunakan untuk tumbuhan yang berkayu.
8. Medium dasar N6: Digunakan untuk tumbuhan sereal terutama padi.
9. Dan lain-lainnya.

Dalam kultur jaringan berdasarkan kondisi fisik, media yang digunakan dapat dilakukan dengan metode padat (*solid method*) dan metode cair (*liquid method*).

a. Metode Padat (*Solid Method*)

Metode padat dilakukan dengan tujuan untuk mendapatkan kalus (induksi kalus) dan kemudian dengan medium diferensiasi yang berguna untuk menumbuhkan akar serta tunas sehingga kalus dapat tumbuh menjadi planlet. Media padat adalah media yang mengandung semua komponen kimia yang dibutuhkan oleh tanaman dan dipadatkan dengan penambahan zat pematat (Gambar 24). Zat pematat tersebut dapat berupa agar-agar batangan, agar-agar bubuk atau agar-agar dalam kemasan kaleng yang khusus digunakan untuk keperluan laboratorium. Agar-agar dalam kemasan kaleng harganya sangat mahal. Oleh karena itu para peneliti biasanya menggunakan agar-agar bubuk dalam

kemasan kertas (bahan makanan). Penggunaan agar-agar ini membutuhkan pengalaman dan ketelitian dalam perhitungan, sehingga medium tersebut tidak terlalu padat atau terlalu lembek. Penggunaan agar-agar kemasan kertas biasanya berkisar 8-10 g/L.



Gambar 24. Media Padat

(sumber:<https://www.google.co.id/search?q=media+kultur+jaringan&tbm>)

Media yang terlalu padat mengakibatkan akar sulit tumbuh, karena akar-akar sulit menembus ke dalam media. Sedangkan medium yang terlalu lembek akan menyebabkan kegagalan yaitu dapat berupa tenggelamnya eksplan yang ditanam. Eksplan yang tenggelam tidak dapat tumbuh menjadi kalus karena area tempat tumbuh kalus yaitu pada irisan jaringan (jaringan yang luka) tertutup medium. Tenggelamnya eksplan di dalam medium juga dapat menyebabkan busuk karena keadaan yang sangat lembab, dan akhirnya akan mengundang jamur ataupun bakteri.

b. Metode Cair (*Liquid Method*)

Suspensi sel dapat diartikan sebagai kultur dari sel-sel bebas di dalam medium cair (Gambar 25). Tujuan khusus dari suspensi sel adalah untuk memecah kalus menjadi *single cell*. Suspensi sel dapat menghasilkan dua macam tipe sel, yaitu *single cell* dan kelompok sel atau gumpalan sel. *Single cell* mempunyai kemampuan untuk tumbuh dan membelah diri dengan baik daripada kelompok sel. Di dalam medium cair, *single cell* akan tampak mengapung dan kelihatan keruh, sedangkan kelompok sel akan mengendap. Oleh karena itu, mendapatkan *single sel* untuk keperluan isolasi protoplas perlu dilakukan penyaringan dengan *nylon filter* sehingga gumpalan sel dapat tertahan, sedangkan *single cell* akan melewati dan dapat ditampung.



Gambar 25. Media Cair

Penggunaan metode cair ini kurang praktis dibandingkan dengan metode padat, karena untuk menumbuhkan kalus langsung

dari eksplan sangat sulit sehingga tingkat keberhasilannya lebih kecil dan hanya tanaman-tanaman tertentu saja yang dapat berhasil. Oleh karena itu, pemakaian media cair lebih ditekankan untuk suspensi sel, yaitu menumbuhkan plb (*protocorm like bodies* atau *protokormus*). Dari protokormus ini nantinya dapat tumbuh menjadi planlet apabila dipindahkan ke dalam media padat yang sesuai. Selain untuk menumbuhkan protokormus, media cair juga digunakan untuk memperbanyak kalus dengan jalan berulang-ulang kali mengadakan sub kultur. Dengan perlakuan sub kultur maka jumlah kalus dapat berlipat ganda. Kalus yang banyak dapat digunakan untuk berbagai keperluan, misalnya untuk diambil metabolit sekundernya, untuk isolasi protoplas dan isolasi kloroplas.

ZPT merupakan senyawa organik bukan hara yang dalam konsentrasi rendah dapat menstimulir atau memacu pertumbuhan dan dalam konsentrasi tinggi dapat menghambat atau mengganggu proses fisiologis tumbuhan. Bila tidak ditambahkan kedalam medium kultur jaringan pertumbuhan tumbuhan atau eksplan dapat terhambat, bahkan mungkin tidak tumbuh sama sekali.

Zat pengatur tumbuh dibagi menjadi 5 kelompok yaitu auksin, sitokinin, giberelin, asam absisat dan etilen. Zat pengatur tumbuh memegang peranan penting dalam pertumbuhan dan perkembangan kultur. Zat pengatur tumbuh yang sering digunakan

dalam kultur jaringan adalah auksin, sitokinin dan giberelin (Gambar 26).

Auksin merupakan zat pengatur tumbuh yang sering digunakan dalam kultur jaringan, terutama untuk pertumbuhan kalus dan pertumbuhan akar. Pada pemberian auksin dengan kadar relatif tinggi, diferensiasi kalus cenderung ke arah pembentukan primordia akar, sedangkan pemberian sitokinin dengan kadar yang relatif tinggi menyebabkan diferensiasi kalus akan cenderung ke arah pembentukan primordia batang atau tunas. Dengan demikian macam dan komposisi penggunaan ZPT pada medium kultur jaringan penting sekali untuk diperhatikan (sangat bergantung pada jenis tumbuhannya). Auksin adalah sekelompok senyawa yang fungsinya merangsang pemanjangan sel-sel pucuk yang spektrum aktivitasnya menyerupai IAA. Pada umumnya auksin meningkatkan pemanjangan sel, pembelahan sel dan pembentukan akar adventif. Dalam pembentukan akar pada tunas jenis auksin yang seringkali digunakan adalah IBA dan NAA, karena efektivitasnya tinggi dan harganya relatif murah.

Sitokinin merupakan zat pengatur tumbuh yang mendorong pembelahan (sitokinesis). Beberapa macam sitokinin merupakan sitokinin alami (kinetin, zeatin). Sitokinin alami dihasilkan pada jaringan yang tumbuh aktif terutama pada akar, embrio dan buah.

Sitokinin yang diproduksi di akar selanjutnya diangkut oleh xilem menuju sel-sel target pada batang. Sitokinin juga dapat meningkatkan pembelahan, pertumbuhan dan perkembangan kultur sel tumbuhan. Jenis sitokinin yang sering ditambahkan dalam medium antara lain adalah: kinetin, zeatin dan BAP.

Giberelin bukan merupakan zat pengatur tumbuh yang esensial. Penggunaannya hanya pada jenis-jenis tumbuhan tertentu saja. Giberelin biasanya digunakan untuk memecahkan dormansi embrio atau biji. Giberelin yang umum digunakan adalah G3. Fungsi utama Giberelin adalah mendorong perkembangan biji, perkembangan kuncup, pemanjangan batang dan pertumbuhan daun, mendorong pembungaan dan perkembangan buah, mempengaruhi pertumbuhan dan diferensiasi akar.



Gambar 26. Berbagai Zat Pengatur Tumbuh

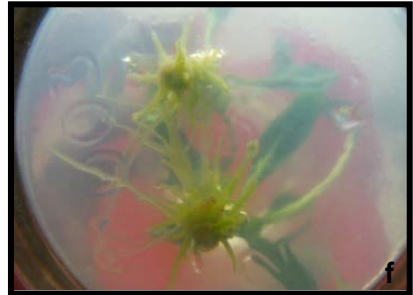
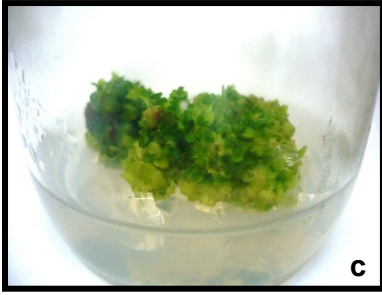
Eksplan merupakan bagian tanaman yang digunakan sebagai bahan awal untuk memperbanyak tanaman dalam kultur

jaringan. Faktor penentu keberhasilan eksplan tergantung pada umur fisiologis, umur ontogenetik, ukuran eksplan, umur eksplan, genotip serta bagian tanaman yang diambil merupakan hal-hal yang harus dipertimbangkan dalam memilih eksplan yang akan digunakan. Umumnya, bagian tanaman yang digunakan sebagai eksplan adalah jaringan muda yang sedang aktif. Jaringan tanaman yang masih muda mempunyai daya regenerasi lebih tinggi, karena sel-selnya masih aktif membelah diri dan relatif lebih bersih daripada bagian-bagian tumbuhan yang sudah tua, dalam hal ini pucuk-pucuk baru yang muncul merupakan eksplan yang potensial. Bagian tanaman yang dapat digunakan sebagai eksplan diantaranya adalah biji, potongan akar, pucuk muda, batang muda, daun muda, kotiledon dan hipokotil, potongan daun, dan lain lain.

Bentuk eksplan lain yang dapat digunakan adalah kalus. Kalus adalah massa sel yang tak terdiferensiasi, yang dibentuk oleh sel-sel tanaman yang aktif membelah dan biasanya terjadi di tempat irisan untuk menutupi luka dalam media. Kultur jaringan tumbuhan yang sering digunakan dalam produksi metabolit sekunder adalah kultur kalus dan kultur suspensi sel. Kultur kalus dan kultur sel tumbuhan secara *in vitro* adalah sumber yang potensial untuk produksi metabolit sekunder.

Perbanyakan tanaman sarang semut sudah pernah dilakukan walau informasinya masih sedikit. Menurut Sudrajat dan Widodo (2014) yang telah melakukan budidaya tanaman *M. pendens* dengan metode kultur jaringan, untuk inisiasi tunas terbaik didapatkan pada penambahan Kinetin 6 mg/l yaitu 5 tunas dan jumlah akar terbanyak yaitu 10 akar. Sudrajat (2012) yang menggunakan sumber eksplan tunas pucuk mendapatkan pertumbuhan tunas sarang semut (*M. pendens*) terbaik diperoleh pada media MS yang diperkaya dengan zat pengatur tumbuh IBA dan BAP 4 mg/l dengan waktu muncul tunas pada hari ke 6, jumlah daun dan akar masing-masing 2 dan panjang akar 4 mm, tapi belum berhasil untuk multiplikasi tanaman. Sari *dkk.*, (2016) telah berhasil memperbanyak tanaman sarang semut (*M. tuberosa*) dengan menggunakan berbagai sumber eksplan seperti kotiledon, batang, umbi, nodus dan akar secara *in vitro* (Gambar 27).





Gambar 27. Budidaya tanaman sarang semut (*M. tuberosa*) secara in vitro dengan berbagai sumber eksplan (a) batang (b) nodus (c) kotiledon (d) umbi (e) akar (f, g) Perakaran sarang semut (h) aklimatisasi sarang semut.

Tumbuhan sarang semut merupakan tumbuhan epifit yang hidup bersimbiosa dengan semut. Pada bagian dalam umbi terdapat domatia atau labirin yang dihuni oleh ratusan semut. Bagian umbi inilah yang sering digunakan sebagai obat. Jika tumbuhan sarang semut akan dibiakkan secara kultur jaringan maka perlu juga kajian yang mendalam tentang kandungan metabolit sekunder yang dihasilkan.

Dalam kultur jaringan faktor lingkungan perlu diperhatikan karena dapat mempengaruhi regenerasi tumbuhan. Beberapa faktor lingkungan dalam kultur jaringan yaitu:

1. Keasaman (pH)

Keasaman (pH) adalah nilai yang menyatakan derajat keasaman atau kebasaaan dari larutan dalam air. Sel-sel tumbuhan yang dikembangkan dengan teknik kultur jaringan mempunyai toleransi pH yang relatif sempit dengan titik optimal antara pH 5,0 dan 6,0.

Pengukuran pH dapat dilakukan dengan pH meter atau menggunakan kertas pH. Bila pH medium kurang dari normal, maka dapat ditambahkan NaOH. Sedangkan apabila pH melampaui batas normal dapat dinetralkan dengan meneteskan HCl. pH yang digunakan dalam kultur jaringan adalah 5,7-5,8.

2. Cahaya

Penyinaran kultur biasanya diberikan dengan lampu TL (neon). Intensitas berkisar antara 600-1000 lux. Panjang atau lama penyinaran pada umumnya mengikuti kebutuhan cahaya tumbuhan lapangan. Panjang penyinaran dapat berlangsung 10-24 jam.

3. Temperatur

Temperatur yang dibutuhkan untuk dapat terjadi pertumbuhan yang optimum umumnya adalah berkisar di antara 20⁰-30⁰C. Sedangkan temperatur optimum untuk pertumbuhan kalus endosperm adalah sekitar 25⁰C.

6.3. Kalus sebagai Sumber Metabolit Sekunder secara In Vitro

Selain untuk budidaya tanaman, kultur jaringan juga digunakan untuk memproduksi metabolit sekunder tanaman. Kultur jaringan mempunyai manfaat besar di bidang farmasi karena dari usaha ini dapat menghasilkan metabolit sekunder sebagai bahan pembuatan obat-obatan.

Pada umumnya untuk mempelajari sintesis metabolit sekunder secara kultur jaringan yang sering digunakan adalah kultur organ, kultur suspensi sel dan kultur kalus. Kultur yang lebih berpotensi untuk digunakan dalam produksi metabolit sekunder adalah kultur suspensi sel dan kultur kalus. Kultur kalus adalah massa sel yang tidak terdiferensiasi, terdiri dari sel parenkim yang

muncul dari sel jaringan induk yang sedang membelah dan biasanya terjadi di tempat irisan untuk menutupi luka dalam media. Pengembangbiakan massal melalui kultur jaringan tak mempengaruhi kandungan senyawa aktif sebuah tanaman. Syaratnya dalam budidaya harus dikondisikan (suhu, iklim, intensitas cahaya, nutrisi) seperti habitat aslinya.

Kultur kalus adalah membiakkan sekelompok sel yang berasal dari jaringan tanaman yang tumbuh dalam medium hara. Medium tersebut terbuat dari garam anorganik, sumber karbon (biasanya sukrosa), auksin dan sitokinin. Komposisi medium merupakan hal yang penting bagi masing-masing spesies yang dibiakkan. Untuk menghasilkan kalus yang baik, zat hara berperan merangsang pertumbuhan sel dengan cepat. Beberapa jaringan tanaman dapat digunakan untuk membentuk biakan kalus seperti akar, batang, daun, meristem dan anther. Namun demikian, untuk spesies-spesies tertentu dari salah satu jenis kalusnya dapat menghasilkan kalus yang lebih baik dari yang lainnya.

Untuk membentuk kalus, jaringan dipisahkan dari tanaman dan permukaan sayatan disterilkan untuk membunuh bakteri atau jamur yang dapat mengkontaminasi biakan. Beberapa peneliti mampu membentuk kalus dari tanaman yang tumbuh dalam kondisi aseptik dengan permukaan biji yang disterilisasi untuk mengurangi

permasalahan kontaminasi mikroorganisme. Jaringan yang diisolasi tersebut ditumbuhkan dalam medium steril pada suhu 20-25°C dan diberikan cahaya yang cukup. Apabila keseimbangan ZPT tepat, maka kalus akan segera terbentuk. Perkembangan kalus dikendalikan oleh hormon yang ditambahkan ke dalam medium, khususnya auksin dan sitokinin. Perubahan kadar hormon dapat mempengaruhi kalus apakah akan membentuk tunas atau akar. Keseimbangan hormon yang diperlukan merupakan hal penting untuk setiap spesies dan sering sangat beragam antara kultivar yang satu dengan yang lain. Salah satu auksin yang berguna dalam pembentukan dan merangsang produksi kalus adalah 2,4-D yang merupakan zpt sintetik.

Keuntungan produksi metabolit sekunder melalui kultur jaringan tumbuhan adalah sebagai berikut:

- a. Melalui kultur jaringan tumbuhan dapat dibentuk senyawa yang bermanfaat dalam kondisi terkontrol dan dalam waktu yang relatif lebih singkat.
- b. Sel-sel tumbuhan dapat diperbanyak dengan mudah untuk memperoleh metabolit tertentu.
- c. Pertumbuhan sel secara otomatis terawasi dan proses metabolisme dapat diatur secara rasional.

- d. Hasil produksi yang diperoleh lebih konsisten, baik dalam kualitas maupun kuantitas, karena kondisi lingkungannya dapat diatur.
- e. Melalui kultur jaringan tumbuhan dapat dibentuk senyawa baru yang tidak terdapat dalam tanaman induknya dan senyawa baru ini mungkin berguna untuk dikembangkan atau dimanfaatkan lebih jauh.
- f. Kultur tidak bergantung pada kondisi lingkungan seperti keadaan geografis, iklim, musim dan tidak memerlukan lahan yang luas.

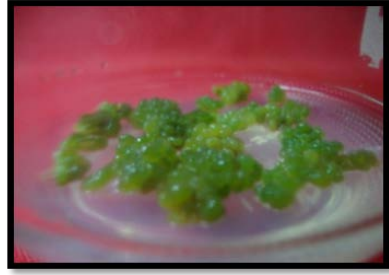
Sari dan Kusuma (2015) telah berhasil menumbuhkan kalus sarang semut pada media Murashige and Skoog (MS) padat dan cair yang diberi penambahan zat pengatur tumbuh 2,4 *Dichlorophenoxyacetic acid* dan Kinetin (Gambar 28 dan Gambar 29). Kalus yang dihasilkan bersifat remah dan berwarna hijau. Kalus dapat digunakan sebagai sumber senyawa metabolit sekunder pengganti bahan dari alam. Dengan menggunakan kalus, pemakaian bagian tumbuhan dari alam sebagai bahan fitofarmaka dapat dikurangi. Hal ini juga berpengaruh positif terhadap konservasi dan pelestarian plasma nutfah tumbuhan apalagi terhadap tumbuhan yang terancam punah.

Menurut anggraeni (2007) salah satu cara yang dapat dilakukan untuk meningkatkan pertumbuhan kalus dalam

memproduksi metabolit sekunder adalah dengan menambahkan pra zat ke dalam media, salah satunya adalah sukrosa. Sukrosa merupakan sumber karbon yang berfungsi sebagai energi yang dibutuhkan oleh sel untuk dapat melakukan pertumbuhan.



(a)



(b)



(c)



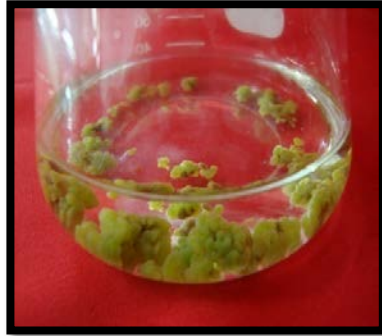
(d)

Gambar 28. Kalus Tanaman Sarang Semut (*M. tuberosa*) pada Media Padat dengan Perlakuan Konsentrasi Sukrosa yang Bervariasi; a=30g/L; b=60g/L; c=90g/L; d=120g/L.

Keterangan: warna kalus  (Hijau), =  (Hijau-Kekuningan).



(a)



(b)




(c)



(d)

Gambar 29. Kalus Tanaman Sarang Semut (*M. tuberosa*) pada Media Cair dengan Perlakuan Konsentrasi Sukrosa yang Bervariasi; a=30g/L; b=60g/L; c=90g/L; d=120g/L.

Keterangan: warna kalus  = (Hijau-Kekuningan).

Informasi tentang perbedaan khasiat tumbuhan sarang semut yang berasal dari inang yang berbeda diperoleh dari penduduk lokal di Kalimantan Timur. Ada pendapat masyarakat yang menyatakan bahwa tumbuhan sarang semut yang menempel pada inang pohon mangga tidak berkhasiat obat dibandingkan dengan tumbuhan sarang semut yang menempel pada pohon inang

jenis lain (seperti pohon beringin, pohon durian, pohon langsung, pohon nangka dan lain-lain). Informasi tersebut tersebar di lingkungan masyarakat lokal dan memerlukan pembuktian ilmiah tentang kebenarannya.

Penelitian Sari dkk (2017) telah membuktikan bahwa perbedaan pohon inang sebagai tempat hidupnya tidak mengakibatkan terjadinya perbedaan metabolit yang dimiliki oleh tumbuhan sarang semut. Uji fitokimia yang dilakukan menunjukkan bahwa pada semua bagian tumbuhan sarang semut (umbi, batang dan daun) dari inang yang berbeda (pohon mangga dan durian) mengandung senyawa metabolit yang sama yaitu flavonoid, fenolik, alkaloid, sedangkan untuk senyawa saponin, steroid dan triterpenoid bervariasi pada setiap bagian tumbuhan. Senyawa saponin hanya terdapat pada organ batang tumbuhan sarang semut, steroid terdapat pada organ umbi dan batang, sedangkan triterpenoid hanya terdapat pada organ daun (Tabel 8)

Tabel 8. Hasil Uji Fitokimia Umbi, Batang dan Daun Tumbuhan Sarang Semut (*Myrmecodia tuberosa* Jack.) dari Inang yang Berbeda (Durian dan Mangga) pada Pelarut Etanol

No	Sumber Eksplan	Tanaman Inang	Flavonoid	Fenolik	Alkaloid	Saponin	Steroid	Triterpenoid
1	Umbi SS (D)	Durian	+	+	+	-	+	-
2	Batang SS (D)	Durian	+	+	+	+	+	-
3	Daun SS (D)	Durian	+	+	+	-	-	+
4	Umbi SS (M)	Mangga	+	+	+	-	+	-
5	Batang SS (M)	Mangga	+	+	+	+	+	-
6	Daun SS (M)	Mangga	+	+	+	-	-	+

Keterangan: + = mengandung metabolit sekunder, - = tidak mengandung metabolit sekunder, D = Durian, M = Mangga, SS = Sarang Semut

Hasil penelitian ini juga membuktikan hal lain yaitu ungkapan yang menyatakan bahwa tumbuhan sarang semut yang tumbuh di pohon inang mangga tidak memiliki kandungan metabolit sekunder yang berpotensi sebagai antioksidan adalah juga tidak benar. Tumbuhan sarang semut yang tumbuh di pohon inang yang berbeda tidak mengakibatkan kandungan metabolit yang dimiliki oleh tumbuhan sarang semut tersebut hilang. Hanya jumlahnya yang berbeda pada masing-masing pohon inang.

Daftar Referensi

- Ahmad, R; E. N. M. Mahbob; Z. M. Noo; N. H. Ismail; N. H Lajis and K. Shaari. 2010. *Evaluation of Antioxidant Potential of Medicinal Plants from Malaysian Rubiaceae (Subfamily Rubioideae)*. African Journal of Biotechnology. 9 (46): 7948-7954.
- Anonim.2009^a. *Myrmecodia Ant Plant*.
<http://dc131.4shared.com/img/120063054/6654d93c/Myrmecodia.pdf>.diakses tanggal 8 Maret 2011.
- Anonim. 2009^b. *Habitat Sarang Semut*.
<http://rumahsemut.co.cc/habitat-sarang-semut>. Diakses pada tanggal 1 Desember 2010.
- Ariani, S.R.D., Irianto, H., Malikhah, I., 2014. *Optimasi Lama Waktu Ekstraksi Guna Menghasilkan Ekstrak Herba Sarang Semut (Myrmecodia Pendans Merr. & Perry) dari Kalteng dengan Aktivitas Antioksidan Tertinggi Disertai Skrining Senyawa Bahan Alam*. Seminar Nasional Kimia dan Pendidikan Kimia VI.
- Bergey, D.H and J. G. Holt. 1994. *Manual of Determinative Bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins. ISBN: 9780683006032 0683006037.
- Brooks, G. F., Butel, J.S., Morse, S.A., 2005. *Mikrobiologi Kedokteran Jawetz, Melnick & Adelberg*. Diterjemahkan oleh Hartanto, H., Rachman, C., Dimanti, A., Diani, A., Edisi 23, Penerbit Buku Kedokteran ECG, Jakarta. Hal 62-71.
- Bunyapraphatsara, N and Lemmens, R.H.M.J. 2003. *Plant Resources of South-East Asia 12(8): Medical and Poisonous Plant 3*. Leiden Backhuys. ISBN: 9057821257.
- Crisaningtyas, F. Dan Rachmadi, A.T., 2010. *Pemanfaatan Sarang Semut (Myrmecodia pendens) Asal Kalimantan Selatan Sebagai Antibakteri*. Jurnal Riset Industri Hasil Hutan, Volume 2, Nomor 2, 31-35.
- Djide dan Sartini. 2008. *Dasar-Dasar Mikrobiologi Farmasi*. Lepas, Makasar.

- Dominika dan Dewi, Y.S.K., 2008. *Aktivitas Antioksidan Ekstrak Fenol Umbi Sarang Semut (Hydnophytum sp.) Pada Berbagai Suhu Penyeduhan*. Agritech. Volume 28 (2): 91-96.
- Entjang, I. 2003. *Mikrobiologi dan Parasitologi untuk Akademi Keperawatan dan Sekolah Tenaga Kesehatan yang Sederajat*. PT. Citra Aditya Bakti: Bandung.
- George, E. F. and P. D. Sherrington. 1984. *Plant Propagation by Tissue Culture (Handbook and Directory of Commercial Laboratories)*. Eastern Press. England.
- Gunawan L.W. 1995. *Teknik Kultur In Vitro dalam Hortikultura*. Penebar Swadaya, Jakarta.
- Gunawan, Suyanto dan Hafizianor. 2009. *Inventarisasi Komposisi Jenis dan Potensi Tumbuhan Sarang Semut (Myrmecodia sp.) Berdasarkan Karakteristik Ekologis Habitatnya di Kawasan Hutan Pengunungan Meratus Kalimantan Timur*. <http://tehtiproduk.files.wordpress.com>. Diakses tanggal 22 Mei 2010.
- Hamburger, M and K. Hostettmann. 1991. *Bioactivity in Plant: The Link between Phytochemistry and Medicine*. Phytochemistry Journal. 30 (12): 3864-3874.
- Handique, J.G., 2011. *Polyphenols as Antioxidants dalam Chemistry of Phenolic Compounds*. State of the Art (Baruah, J.B., Editor), Nova Science Publishers, Inc., New York.
- Harmita dan M. Radji. 2008. *Buku Ajar Analisa Hayati Edisi 3*. EGC: Jakarta.
- Harborne, J.B., 1989. *Flavonoid dalam Natural Products of Woody Plant (Rowe, J.W., Editor)*. Springer-Verlag, New York.
- Harborne, J.B., 1989. *General Procedures and Measurement of Total Phenolics dalam Methods in Plant Biochemistry*. (Dey, P.M. dan Harborne, J.B., Editor), Volume 1, Academic Press, London.
- Hartanto, H. 2006. *Konsep Dasar Farmakologi: Panduan Untuk Mahasiswa Edisi 3*. EGC: Jakarta.

- Hasudungan, F. 2008. *Ekosistem Laguna Teluk Belukar Serta Ospek Sosial Ekonomi Masyarakat di Desa Teluk Belukar Kecamatan Gunung Sitoli Utara, Kabupaten Nias Provinsi Sumatera Utara*. Wetlands Internasional, Indonesia Programme. Bogor.
- Hendaryono, D. P. S dan A. Wijayani. 1994. *Teknik Kultur Jaringan*. Kanisius, Jakarta.
- Huxley, C. R and M. H. P. Jebb. 1993. *The Tuberos Ephypt from Rubiaceae 5: A Revition Myrmecodia*. Blumea 37:271-334
- Hostettmann, K. Dan Marston, A., 2006. *Separation and Quantification of Flavonoids dalam Flavonoid, Chemistry, Biochemistry and Applications*. (Andersen, Q.M. dan Markham, K.R., Editor), CRC Press, New York.
- Hertiani, T., Ediati, S., Saad, S. & Ulfah, M. 2010. *Preliminary Study on Immunomodulatory Effect of Sarang-Semut Tubers Myrmecodia tuberosa and Myrmecodia pendens*. OJBS10(3): 136-141
- Jawetz, E., Melnick, J. L., dan Adelberg, E. A., 1996. *Mikrobiologi Kedokteran Edisi 20*. EGC: Jakarta.
- Krishnamoorthy, H. N. 1981. *Plant Growth Substances*. Including Applications in Agriculture. Mc. Graw-Hill Offices. New Delhi
- Lay, B. 1994. *Analisis Mikroba di Laboratorium*. PT Raja Grafindo Persada: Jakarta.
- Lisdawati, V., S. Wiryowidagdo., L. B. S. Kardono. 2006. *Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) dari Berbagai Fraksi Ekstrak Daging Buah dan Kulit Biji Mahkota Dewa (Phaleria marcocarpa)* Panel Kesehatan Volume 34 (3).
- Manoi, F. 2008. *Sarang Semut (Myrmecodia) Tanaman Obat Berpotensi Menyembuhkan Berbagai Penyakit*. Warta Penelitian dan Pengembangan Tanaman Industri: Bogor.
- Manthell, S. H and Smith. 1983. *Cultural Factor that Influence Secondary Metabolites Accumulation in Plant Cell & Tissue Culture*. In: Plant Biotechnology. Mantell S. H. & Smith (eds). Cambridge Univ. Press, Cambridge.

- Mardany, M.P., Chrystomo, L.Y., Karim, A.K., 2016, *Skринing Fitokimia dan Uji Sitotoksik dari Tumbuhan Sarang Semut (Myrmecodia beccarii Hook.f.) Asal Kabupaten Merauke*. Jurnal Biologi Papua. Volume 8 (1:), 13-22.
- Markom, M; M. Hasan; W. R. W. Daud; H. Singh and J. M. Jamin. 2007. *Extraction of Hydrolysible Tannins from Phyllanthus niruri Linn: Effect of Solvents and Extraction Methods*. Separation and Purification Technology Journal. 52: 487-496
- McLaughlin, R. L. 1998. *The Use of Biological Assays to Evaluate Botanical*. Drugs Informations Journal. Volume 32: 513-524.
- Meilisa. 2008. *Uji Aktivitas Anti Bakteri dan Formulasi Dalam Sediaan Kapsul Dari Ekstrak Etanol Rimpang Tumbuhan Temulawak (Curcuma xanthorrhiza, Roxb) Terhadap Beberapa Bakteri*. Radji, M. 2011. Mikrobiologi. Buku Kedokteran ECG, Jakarta.
- Meyer, B.N., N.R. Ferrigni, J.E. Putnam, L.B. Jacobsen, D.E. Nichols and J.L. McLaughlin. 1982. *Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents*. Medical Plant Research Journal. 45: 31-34.
- Mogea, J. P dan J. R. Welsh. 1991. *Dasar-dasar Genetika dan Pemuliaan Tanaman (Terjemahan)*. Erlangga, Jakarta.
- Motohashi, N. Dan Sakagami, H., 2009. *Anthocyanins as Functional Food Colors dalam Topics in Heterocyclic Chemistry (Gupta, R.R. Editor)*. Volume 16, Springer, Berlin.
- Mudjiman. 1983. *Udang Renik Air Asin (Artemia salina)*. Bhatara: Jakarta.
- Murti, Y. B. 2006. *Isolation and Structure Elucidation of Bioactive Secondary Metabolites from Sponges Collected at Ujung Pandang and in the Bali Sea, Indonesia*. Dissertation Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultat der Heinrich-Heine-Universität Dusseldorf.
- Oliveira, J., Mateus, N., dan Freitas, V., 2013. *Flavanols: Catechins and Proanthocyanidins dalam Natural Products : Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids,*

- Phenolics and Terpenes* (Ramawat, K.G & Merillon, J.M., Editor). Springer Verlag, Berlin.
- Pelczar, M.J dan E.C.S Chan. 2007. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Diterjemahkan oleh Ratna Siri hadioetomo dkk., Universitas Indonesia Press: Jakarta.
- Todar, K. (1998) *Bacteriology 330 Lecture Topics: Staphylococcus*. Kenneth Todar University of Wisconsin Department of Bacteriology, Wisconsin, USA.
- Peraturan Menteri Kehutanan Nomor: P.35 (2007). *Tentang Hasil Hutan Bukan Kayu*. http://www.dephut.go.id/INFORMASI/web_HHBK/permen_p35.pdf. diakses 10 desember 2011.
- Pierik, R.L.M. 1987. *In Vitro Culture of Higher Plants*. Martinus Nijhoff Publisher, Lancaster.
- Pratiwi, S.T. 2008. *Mikrobiologi Farmasi*. Jakarta: Erlangga
- Prachayasittikul S; P. Buraparuangsang; A. Worachartcheewan; C. Isarankura-Na-Ayudhya, S. Ruchirawat and V. Prachayasittikul. 2008. *Antimicrobial and Antioxidative Activities of Bioactive Constituents from Hydnophytum formicarum Jack*. Journal Molecules. ISSN 1420-3049. 13:904-921.
- Ríos, J.L, & Recio, M.C., 2005. *Perspective paper, Medicinal plants and antimicrobial activity*. Journal of Ethnopharmacology, 100, 80-84.
- Robinson, T. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. ITB: Bandung.
- Rothwell, J., Morand, C., Manach, C., 2012. *Bioavailability of Flavanones dalam Flavonoids and Related Compounds, Bioavailability and Function*, (Spencer, J.P.E dan Crozier, A., Editor). CRC Press, New York.
- Salisbury, F.B. dan C. W. Ross. 1995. *Fisiologi Tumbuhan*. Jilid 3. (diterjemahkan oleh Diah R.L dan Sumaryono). ITB, Bandung.

- Sarma, J.C., 2011. *Naturally Occurring Polyphenols and Their Utility dalam Chemistry of Phenolic Compound*. State of the Art, (Baruah, J.B., Editor), Nova Science Publisher, New York.
- Sari, Y. P., W. Kustiawan, S. Sukartiningsih, and A. Ruchaemi. 2017. *The Potential of Secondary Metabolites of Myrmecodia Tuberosa from Different Host Trees*. Nusantara Bioscience 9: 170-174.
- Sari, Y.P., W. Kustiawan, Sukartiningsih dan A. Ruchaemi. 2016. *Micropropagation of Myrmecodia tuberosa Jack.:A Medicinal Plant From Borneo*. International Journal Of Scientific & Technology Research Volume 5, Issue 09. Issn 2277-8616 224.
- Sari, Y. P., and R. Kusuma. 2015. *Modifikasi konsentrasi sukrosa pada media padat dan cair untuk pertumbuhan kalus tanaman sarang semut (Myrmecodia tuberosa jack.) secara in vitro*. Bio Wallacea Jurnal Ilmiah Ilmu Biologi 1: 9-13.
- Soeksmanto, A., P. Simanjuntak., M. A. Subroto. 2010. *Uji Toksisitas Akut Ekstrak Air Tanaman Sarang Semut (Myrmecodia pendans) Terhadap Histologi Organ Hati Mencit*. Jurnal Natur Indonesia Volume 12 (2).
- Stobiecki, M. Dan Kachlicki, P., 2006. *Isolation and Identification of Flavonoids dalam The Science of Flavonoids* (Grotewold, E., Editor), Springer, New York.
- Subroto, M. A dan Saputro, H. 2008. *Gempur Penyakit dengan Sarang Semut*. Penebar Swadaya: Jakarta.
- Subroto, A. 2009. *Obat Alternatif: Sarang Semut Penakluk Penyakit Maut*, <http://herbaljawa.blogspot.com/2009/07/Obat-alternatif-sarang-semut-penakluk-penyakit-maut.html>. Diakses hari Sabtu, 20 Juli 2016, pukul 22.21 WITA di Samarinda.
- Sudrajad, H. 2012. *Upaya Pembibitan Biji Sarang Semut (Myrmecodiapendans) dengan Kultur Jaringan*. Agriekonomika 1(1):47-51. ISSN2301 – 9948. e ISSN 2407 – 6260.

- Sudrajad, H dan H. Widodo. 2014. *Kultur Jaringan Tanaman Sarang Semut (M. pendans)*. Prosiding Seminar Nasional Biodiversitas. Jurusan Biologi. FMIPA-UNS. 3(2): 67-70.
- Supriatno. 2014. Antitumor activity of Papua's *Myrmecodia pendans* in Human Oral Tongue Squamous Cell Carcinoma Cell Line Through Induction of Cyclin-dependent Kinase Inhibitor p27Kip1 and Suppression of Cyclin E. *Journal of Cancer Research & Therapy* 2 (3): 48-53
- Suryowinoto, M. 1996. *Pemuliaan Tanaman Secara In Vitro*. Kanisius, Yogyakarta.
- Swanson, H., 2016. *Flavonoids, Inflammation and Cancar*. World Scientific. New Jersey.
- Tabata, M. 1977. *Recent Advances in The Production of Medical Substances by Plant Cell Cultures*. In: Barz; Reinhard and Zenk (eds). *Plant Tissue Culture and Its Biotechnological Application*. pp 3-16. Springer-Verlag, New York.
- Wattimena, G. A. 1992. *Bioteknologi Tanaman*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Pusat Antar Universitas Bioteknologi. IPB, Bogor.
- Teresa, S.P., Ballesta, M.T.S., Viguera, C.G., 2013. *Anthocyanins dalam Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes* (Ramawat, K.G & Merillon, J.M., Editor). Springer Verlag. Berlin.
- Todar, K. (1998) *Bacteriology 330 Lecture Topics: Staphylococcus*. Kenneth Todar University of Wisconsin Department of Bacteriology, Wisconsin. USA.
- Weinreb, O., Amit, T., Youdim, M.B.H., Mandel, S., 2012. *Green Tea Flavan-3-ol and Their Role in Protecting Against Alzheimer's and Parkinson's Disease Pathophysiology dalam Flavonoids and Related Compounds, Bioavailability and Function*, (Spencer, J.P.E dan Crozier, A., Editor). CRC Press. New York.
- Winkel, B.SJ., 2006. *The Biosynthesis of Flavonoids dalam The Science of Flavonoids* (Grotewold, E., Editor). Springer. New York.

Yusnita, 2003. *Kultur Jaringan Cara Memperbanyak Tanaman Secara Efisien*. Agromedia Pustaka, Bogor.

Zulkarnain. 2009. *Kultur Jaringan Tanaman*. Bumi Aksara, Jakarta.

Glosary

Abiotik adalah komponen lingkungan yang terdiri atas selain makhluk hidup.

Anorganik adalah bahan-bahan non hayati yang tidak dapat diuraikan.

Antioksidan adalah senyawa atau zat yang dapat menghambat, menunda, mencegah atau memperlambat reaksi oksidasi meskipun dalam konsentrasi yang kecil.

Apoptosis adalah kematian sel terprogram, yang terjadi sangat sistematis.

Auksin adalah zat hormon tumbuhan yang ditemukan pada ujung batang, akar dan pembentukan bunga yang berfungsi sebagai pengatur pembesaran sel dan memicu pemanjangan sel di daerah belakang meristem ujung.

Autotrof adalah organisme yang dapat mengubah bahan anorganik menjadi bahan organik. organik (dapat membuat makanan sendiri) dengan bantuan energi seperti energi cahaya matahari dan kimia.

Biotik adalah komponen lingkungan yang terdiri atas makhluk hidup.

Diferensiasi adalah proses ketika sel kurang khusus menjadi jenis sel yang lebih khusus.

Eksplan merupakan bagian tanaman yang digunakan sebagai bahan awal untuk memperbanyak tanaman dalam kultur jaringan.

Enzim adalah biomolekul berupa protein yang berfungsi sebagai katalis dalam suatu reaksi kimia.

Farmakokimia adalah ilmu untuk merancang struktur senyawa obat, mensintesisnya, serta mengevaluasi aktivitasnya terhadap penyakit.

Farmakologi sebagai ilmu pengetahuan yang mempelajari interaksi obat dengan tubuh untuk menghasilkan efek terapi (therapeutic).

Flavonoid sebagai salah satu kelompok senyawa fenolik dengan struktur $C_6-C_3-C_6$ dan banyak terdapat pada jaringan tanaman yang berperan sebagai antioksidan.

Giberelin merupakan hormon yang berfungsi terhadap perkembangan dan perkecambahan embrio.

Herbivora adalah hewan yang hanya makan tumbuhan.

In vitro adalah percobaan dilakukan dalam kondisi laboratorium yang kondisinya terkontrol.

Isolasi adalah proses pengambilan atau pemisahan bahan alam dengan menggunakan pelarut yang sesuai.

Kalus adalah massa sel yang tak terdiferensiasi, yang dibentuk oleh sel-sel tanaman yang aktif membelah dan biasanya terjadi di tempat irisan untuk menutupi luka dalam media.

Koloni adalah sekumpulan dari bakteri-bakteri yang sejenis yang mengelompok menjadi satu dan membentuk suatu kelompok.

Karsinogen adalah zat yang menyebabkan penyakit kanker.

Kultur jaringan: Kultur Jaringan diartikan pula dengan memelihara & menumbuhkan organ tanaman (embrio, tunas, bunga dsb) atau jaringan tanaman (sel, kalus, protoplast) pada kondisi aseptik dan terkendali.

Maserasi merupakan proses isolasi dengan cara perendaman sampel dengan pelarut organik dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruang.

Metabolit sekunder adalah senyawa-senyawa organik yang berasal dari tanaman yg tidak esensial bagi tanaman dan secara umum memiliki kemampuan bioaktif.

Mikroorganisme adalah organisme yang sangat kecil dan tidak dapat dilihat dengan mata telanjang sehingga untuk mengamati bantuan sarana yang diperlukan.

Morfologi adalah sebuah cabang di dalam ilmu biologi yang secara khusus mempelajari tentang bentuk struktur / bentuk luar dari sebuah organisme.

Nonpolar adalah senyawa yang terbentuk akibat adanya suatu ikatan antar elektron pada unsur-unsur yang membentuknya.

Organik adalah bahan-bahan hayati yang dapat diuraikan kembali.

Parasit adalah organisme yang menggantungkan sebagian atau seluruh sumber energinya pada organisme lain.

Patogen adalah agen biologis yang menyebabkan penyakit pada inangnya.

Polar adalah senyawa yang terbentuk akibat adanya suatu ikatan antar elektron pada unsur-unsurnya.

Protoplasma adalah bagian hidup dari sebuah sel yang dikelilingi oleh membran plasma.

Saprophyt adalah cara hidup menumpang pada sisa makhluk hidup lain.

Senyawa fenolik merupakan metabolit sekunder tanaman serta komponen penting dalam kualitas sensoris dan nutrisi buah, sayuran, dan tanaman lainnya.

Simbiosis adalah hubungan timbal balik antara dua makhluk hidup yang saling berdampingan.

Sitokinin adalah senyawa yang dapat meningkatkan pembelahan sel pada jaringan tumbuhan serta mengatur pertumbuhan dan perkembangan tanaman.

Taksonomi adalah ilmu yang mempelajari identifikasi, tata nama, dan klasifikasi, yang biasanya terbatas pada objek biologi.

Tanin adalah suatu senyawa polifenol yang berasal dari tumbuhan, mempunyai rasa pahit dan kelat, bereaksi dengan dan menggumpalkan protein, atau berbagai senyawa organik lainnya, termasuk asam amino dan alkaloid.

Teknik aseptik/asepsis adalah segala upaya yang dilakukan untuk mencegah masuknya mikroorganisme ke dalam tubuh yang kemungkinan besar akan mengakibatkan infeksi.

Tokoferol adalah senyawa antioksidan yang larut dalam lemak dan ditemukan dalam minyak sayur.

Tumbuhan epifit adalah tumbuhan yang tumbuh dengan cara menumpang pada tumbuhan lain sebagai tempat hidupnya, akarnya tidak berada pada tanah, melainkan menempel pada tumbuhan.

Zoologi adalah sebuah cabang ilmu dari biologi dimana mempelajari mengenai perilaku, struktur, evolusi dan fungsi hewan.

BIODATA PENULIS



Yanti Puspita Sari

Penulis lulusan S1 Program Studi Biologi dari FMIPA Universitas Andalas Padang tahun 2003 dan lulusan magister S2 Program Studi Biologi dari Institut Pertanian Bogor (IPB) tahun 2013. Pada tahun 2016 penulis menyelesaikan S3 Ilmu Kehutanan, Mulawarman. Penulis adalah dosen tetap di Program Studi Biologi Fakultas MIPA Universitas Mulawarman Samarinda. Mengampu mata kuliah Biologi Dasar, Biologi

Sel, Struktur Perkembangan Tumbuhan, Fitopatologi, Pemuliaan Tanaman, Tanaman Budidaya & Industri, Kultur Jaringan dan Bioteknologi. Pernah menerbitkan beberapa jurnal internasional dan aktif mengikuti seminar nasional maupun internasional.

Kontak person: ypsman2002@yahoo.com

BIODATA PENULIS

Chairul Saleh



Penulis lulus sarjana S1 dari Fakultas MIPA Universitas Sumatera Utara pada tahun 1998 dan lulus magister S2 Ilmu Kimia dari Universitas Padjadjaran pada tahun 2002. Pada tahun 2007 penulis menyelesaikan S3 Ilmu Kimia dari Universitas Sumatera Utara. Penulis adalah dosen tetap di Program Studi Kimia Fakultas MIPA Universitas Mulawarman Samarinda. Mengampu mata kuliah kimia

organik, kimia organik fisik, kimia bahan obat, kimia organik bahan alam dan elusidasi struktur. Buku yang telah diterbitkan yaitu Kimia Triterpenoid dan aktif mengikuti seminar nasional maupun international.

Kontak person: chairul.saleh@fmipa.unmul.ac.id
chairul.unmul@gmail.com

BIODATA PENULIS



Eko Kusumawati.

Lulus S1 dari Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Mulawarman Samarinda tahun 2007, lulus S2 dari Program Magister pada Program Studi Teknologi Hasil Pertanian Kekhususan Bioteknologi Agroindustri Universitas Brawijaya Malang tahun 2009. Saat ini adalah dosen tetap di Program Studi Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Mulawarman Samarinda. Mengampu mata kuliah Mikrobiologi Dasar, Sistematika Mikrobia, Mikologi, Mikrobiologi Pangan, Mikrobiologi Industri, Mikrobiologi Lingkungan, Fitopatologi dan Bioremediasi. Beberapa publikasi telah diterbitkan dan aktif mengikuti seminar nasional maupun internasional. Pernah mengikuti bimbingan teknis pada tahun 2018 dalam bidang Bioengineering yang diadakan oleh Kementerian Riset dan Pendidikan Tinggi di Universitas Brawijaya Malang.

Kontak: eko.kusumawati11@gmail.com
eko.kusumawati11@fmipa.unmul.ac.id

BIODATA PENULIS



Rudy Agung Nugroho.

Lulus S1 dari Fakultas Biologi Universitas Atma Jaya Yogyakarta tahun 1997, lulus S2 dari program Pascasarjana Biologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta tahun 2001. Pada tahun 2014 telah menyelesaikan studi S3 di Faculty of Science and Engineering, Perth, Western Australia. Saat ini adalah dosen tetap di Program Studi Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas

Mulawarman Samarinda.

Mengampu mata kuliah fisiologi hewan, struktur perkembangan hewan, biologi sel dan molekuler, dan Metodologi penelitian. Beberapa publikasi internasional terindeks Scopus telah diterbitkan dan pernah mengikuti seminar internasional di Praque, Czech Republic dan Melbourne, Australia sebagai pembicara utama. Beberapa kursus singkat dalam bidang biologi molekuler pernah diikuti di UGM, IPB serta di India dan Jepang. Buku-buku yang telah diterbitkan yaitu: Mudah membuat referensi dan bibliografi, Reproduksi perkembangan hewan, dasar-dasar endokrinologi dan Potensi bahan hayati sebagai imunostimulan hewan akuatik.

Kontak: rudysatriana@yahoo.com
rudyagung.nugroho@fmipa.unmul.ac.id

Potensi Sarang Semut Sebagai Bahan

Fitofarmakokimia

Bidang farmakokimia telah menjadi hal penting akhir-akhir ini. Farmakokimia berkaitan dengan penemuan, desain, dan sintesis senyawa aktif biologis dan reaksi dalam makhluk hidup. Sayangnya bahan pembuatan atau bahan dasar farmakokimia dari bahan alam terus mengalami penurunan dalam jumlah, apalagi yang berasal dari tanaman langka. Sebagai alternatif, dengan metode kultur jaringan, tumbuhan seperti sarang semut dibudidayakan dan dimanfaatkan bahan aktifnya sebagai fitofarmakokimia.

Buku ini memaparkan tentang potensi tumbuhan sarang semut (*Mymecodia tuberosa*) sebagai bahan dasar fitofarmakokimia yang memiliki antioksidan yang tinggi yang telah terbukti bersifat sebagai anti kanker dan juga bermanfaat sebagai agensia biologi seperti antibakteri, antivirus, anti fungal dan masih banyak lagi.

Untuk membagi informasi tentang senyawa-senyawa aktif dari tumbuhan sarang semut dan potensinya sebagai sumber fitofarmakokimia ini, buku tentang “potensi sarang semut sebagai bahan fitofarmakokimia” ini ditulis. Buku ini disusun sebagai bahan pengetahuan untuk menambah wawasan tentang potensi sarang semut dan bahan aktif yang terkandung. Buku ini diperuntukkan bagi mahasiswa maupun pengajar yang melakukan penelitian yang berhubungan dengan tumbuhan sarang semut serta teknik kultur jaringan dan beberapa aspek kimiawi serta mikrobiologi.



**Mulawarman
University PRESS**

Penerbit
Mulawarman University PRESS
Gedung LP2M Universitas Mulawarman
Kampus Gunung Kelua, Jl. Krayan, Samarinda
Provinsi Kalimantan Timur, INDONESIA 75123
Telp/Fax. (0542) 747432, Email : mup@lppm.unmul.ac.id

ISBN 978-602-6834-53-9



9 786026 834539