

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar belakang

Tanaman sambung nyawa (*Gynura procumbens*) merupakan salah satu tanaman asli Indonesia yang memiliki banyak potensi sebagai obat. Secara tradisional, masyarakat di Indonesia menggunakan *G. procumbens* untuk mengobati sakit demam, kolesterol, tumor jinak, ginjal, terkena bisa ular, disentri, dan penghilang rasa sakit (Dai *et al.*, 2007). Beberapa penelitian ilmiah menyebutkan bahwa *G. procumbens* juga memiliki potensi menjadi obat kanker (Jenie *et al.*, 2006; Meiyanto *et al.*, 2007; Nurulita *et al.*, 2012), meningkatkan imunomodulator (Takanashi & Matsuoka, 2019), berpotensi sebagai agen vasodilatasi (Hoe *et al.*, 2011; Ng *et al.*, 2013), memiliki aktivitas antidiabetik (Algariri *et al.*, 2013), memiliki aktivitas antivirus (Jarikasem *et al.*, 2013), memiliki aktivitas anti-inflamasi (Iskander *et al.*, 2002), dan berpotensi sebagai antioksidan (Rosidah *et al.*, 2008; Krishnan *et al.*, 2015). Senyawa bioaktif dari *G. procumbens* yang banyak berperan untuk kesehatan adalah senyawa golongan flavonoid (Tan *et al.*, 2016). Senyawa flavonoid yang terkandung dalam *G. procumbens* yaitu, golongan flavonol antara lain kuersetin dan kaempferol (Akowuah *et al.*, 2002; Rosidah *et al.*, 2008, Kim *et al.*, 2011) dan flavanon (*homoesperetin 7-rutinoside*) (Manogaran *et al.*, 2019).

Berdasarkan Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia No. HK.01.07/MENKES/187/2017, *G. procumbens* merupakan salah satu tanaman yang masuk ke dalam susunan formularium ramuan obat tradisional karena berpotensi sebagai tanaman berkhasiat obat (KEPMENKES, 2017). Badan pengkajian dan penerapan teknologi menyebutkan bahwa *G. procumbens* merupakan salah satu tanaman yang harus dikembangkan sebagai target Bahan Baku Obat Tradisional (BBOT) hingga tahun 2025 (BPPT, 2017). Berdasarkan informasi dari situs cek produk BPOM RI (2022), diketahui banyak produk berbahan baku simplisia (basah maupun kering) dan ekstrak *G. procumbens* terdaftar sebagai produk jamu dan obat tradisional. Dari tinjauan di atas, pengembangan dan produksi BBOT yang berasal dari *G. procumbens* sangat memiliki potensi yang besar untuk kebutuhan industri produk fitofarmaka terstandar dan farmasi, bahkan untuk kebutuhan ekspor bahan baku obat.

Faktor penting dalam pengembangan produk fitofarmaka oleh industri farmasi adalah ketersediaan dan pengolahan bahan baku tanaman obat dari hulu ke hilir (Wibowo, 2019).

Selama ini, BBOT untuk industri farmasi penghasil produk obat tradisional mendapatkan suplai bahan baku dari pengambilan langsung di alam dan budidaya tanaman, sehingga bahan baku tidak tersedia secara kontinyu (Kurniawati, 2019). Permasalahan lainnya adalah rendahnya mutu bahan baku, ketidakseragaman bahan baku karena diambil langsung dari alam dan daerah yang berbeda dan belum adanya standar operasional distribusi dan produksi bahan baku yang baik (Kurniawati, 2019). Rantai distribusi BBOT yang tidak terkontrol menyebabkan harga tanaman obat sangat murah pada tingkat petani, sehingga banyak petani tanaman obat tidak lagi tertarik untuk membudidayakan tanaman obat. Selain itu, prioritas stok kebutuhan BBOT dalam negeri selalu lebih sedikit dibandingkan jumlah BBOT yang diekspor (BPPT, 2017).

Budidaya tanaman secara *in vitro* menggunakan teknik kultur jaringan adalah salah satu cara memperoleh bahan baku tanaman obat secara kontinyu, terkontrol baik secara kualitas maupun kuantitas, serta tidak tergantung musim. Kultur jaringan tanaman merupakan salah satu metode yang efektif untuk budidaya sekaligus memproduksi tanaman obat yang mengandung senyawa metabolit sekunder potensial dalam skala besar. Keuntungan menggunakan metode kultur jaringan untuk budidaya tanaman berkhasiat obat yaitu produksi dapat dilakukan sepanjang tahun, kondisi lingkungan budidaya mudah disesuaikan dan terkendali, hasil produksi biomassa dapat diprediksi, serta mampu menyediakan produksi senyawa metabolit sekunder dalam sel tanaman dengan kualitas yang seragam dibandingkan dengan teknik budidaya konvensional (Karuppusamy, 2009; Delgado-Vargas *et al.*, 2000). Dalam perkembangan budidaya *in vitro* tanaman, kultur sel tanaman merupakan metode yang pertama kali dikembangkan untuk menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang optimal (Misawa, 1994). Dalam perkembangan selanjutnya, metode kultur sel tanaman dianggap memiliki keterbatasan dalam menyediakan hasil produksi biomassa dan kualitas metabolit sekunder (Murthy *et al.*, 2019), karena kultur sel tidak memiliki stabilitas genetik yang baik dalam proses kultur dalam jangka waktu yang lama (Lee *et al.*, 2018). Sebagai alternatif metode selanjutnya, telah dikembangkan metode kultur diferensiasi sel atau kultur organ seperti tunas, akar rambur, akar adventif, dan embrio/*protocorm* untuk memproduksi metabolit sekunder secara kontinyu (Murthy *et al.*, 2019).

Saat ini, kultur akar adventif merupakan salah satu metode kultur organ yang sangat efektif untuk menjadi solusi dari permasalahan kekurangan lahan budidaya, ketidakseragaman kriteria bahan baku, ketidakseragaman kandungan senyawa bioaktif tanaman, serta permasalahan pasca panen (Murthy *et al.*, 2016). Kultur organ lainnya seperti kultur

tunas dan embrio/*protocorm* tidak sesuai digunakan dalam produksi dengan kapasitas besar dan berkelanjutan karena keterbatasan pertumbuhannya saat *scale up* menggunakan bioreaktor (Murthy *et al.*, 2019). Keterbatasan lainnya juga terdapat pada kultur akar rambut, kultur akar rambut dianggap belum memenuhi standar keamanan pangan terkait hasil efikasi produk akar rambut yang digunakan sebagai bahan makanan, obat-obatan, dan nutrasetikal terhadap kesehatan, walaupun memiliki potensi yang besar untuk di lakukan *scale up* industrial menggunakan bioreaktor (Murthy *et al.*, 2019). Disisi lain, kultur akar adventif telah berhasil *discale up* secara dalam industri komersial untuk memproduksi metabolit sekunder tanaman (Bhojwani & Razdan, 1996; Murthy *et al.*, 2014b; Baque *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2014). Produk dari kultur akar adventif terjamin keamanannya karena tidak beracun dan tidak bersifat karsinogenik (Murthy *et al.*, 2015). Oleh karena itu *Food and Drug Administration* (FDA) memberikan persetujuan untuk produksi masal akar adventif *P.ginseng* dan *Echinacea purpurea* dan senyawa bioaktifnya untuk bahan baku makanan, obat, dan kosmetik melalui teknik kultur sel, jaringan dan organ (Murthy *et al.*, 2014a).

Kultur adventif dan penggunaan media cair dalam kultur jaringan merupakan cara yang optimal untuk menghasilkan biomassa dan produksi senyawa metabolit sekunder secara *in vitro* (Manuhara, 2014; Van Ket *et al.*, 2012; Yeoman & Yeoman, 1996; Cui *et al.*, 2010). Banyak studi mengenai kultur akar adventif untuk menghasilkan biomassa dan metabolit sekunder (flavonoid dan fenol), antara lain kultur akar adventif *Hypericum perforatum* (L.) (Cui *et al.*, 2010), *Echiancea purpurea* (L.) (Wu *et al.*, 2008), *Raphanus sativus* (L.) cv. Peking (Betsui *et al.*, 2004), *Iris germanica* (Akashi *et al.*, 2005), dan *G. procumbens* (Saiman *et al.*, 2012). Kultur akar adventif dalam bioreaktor merupakan suatu metode untuk produksi senyawa metabolit sekunder tanaman dalam skala besar (Baque *et al.*, 2012; Bais *et al.*, 2001; Flores *et al.*, 1999).

Bioreaktor merupakan alat bioteknologi yang mengkombinasikan kondisi fisik dan kimia lingkungan yaitu, dengan memanfaatkan media cair dan sistem udara yang dirancang untuk memantau dan mengendalikan kondisi lingkungan mikro meliputi, aerasi, suhu, pH, oksigen terlarut, dan lainnya (Karuppusamy, 2009; Mehrotra *et al.*, 2007). Salah satu jenis bioreaktor *airlift* yang sering digunakan dalam kultur akar adventif adalah *Balloon Type Bubble Bioreactor* (BTBB) (Choi *et al.*, 2000; Paek *et al.*, 2001; Baque *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2014; Murthy *et al.*, 2014a). Hingga saat ini, ada dua tipe bioreaktor yang telah digunakan dalam studi kultur akar adventif *G. procumbens*, yaitu bioreaktor *Temporary Immersion Bioreactor* (TIS) (Kusuma *et al.*, 2016) dan BTBB (Faizah *et al.*, 2018;

Manuhara *et al.*, 2019). Penggunaan BTBB diketahui memberikan hasil biomassa yang terbaik (Manuhara *et al.*, 2017). Bioreaktor yang digunakan dalam penelitian sebelumnya adalah BTBB dengan kapasitas 1 L dengan penggunaan volume media berkisar 500 mL hingga 600 mL (Faizah *et al.*, 2018; Manuhara *et al.*, 2019).

Untuk memperoleh hasil yang optimal, perlu dilakukan optimasi beberapa faktor penting dalam budidaya *in vitro* menggunakan bioreaktor. Paek *et al.* (2001; 2005) menyebutkan, optimasi kondisi fisik lingkungan kultur meliputi, aerasi, inokulum dan cahaya penting dalam meningkatkan biomassa akar adventif. Selain itu, Lee *et al.* (2014) menyebutkan optimasi kondisi kimia lingkungan kultur seperti konsentrasi mineral media, konsentrasi sukrosa, pH dalam kultur akar adventif perlu dioptimalkan menyesuaikan dengan tipe eksplan dan target metabolit sekunder yang diinginkan.

Aerasi dan densitas inokulum merupakan faktor fisik utama yang perlu dikontrol dalam kultur akar adventif menggunakan bioreaktor. Aerasi ke dalam media kultur memberikan sirkulasi dan suplai oksigen terlarut untuk mempercepat pertumbuhan tanaman dalam kultur jaringan (George, 2008; Afreen, 2008). Penentuan perbedaan ukuran atau densitas inokulum dalam budidaya *in vitro* merupakan faktor yang penting dilakukan, terutama dalam budidaya menggunakan bioreaktor (Steingroewer *et al.*, 2013). Baque *et al.* (2013) menyebutkan bahwa kerapatan inokulum sangat berpengaruh pada pertumbuhan dan produksi senyawa bioaktif dalam sel tanaman. Pada penelitian kultur akar adventif *M.citrifolia* (Baque *et al.*, 2014) dan *E. koreanum* (Lee *et al.*, 2014), optimasi laju aerasi dan densitas inokulum diketahui dapat mempengaruhi hasil produksi biomassa dan senyawa bioaktifnya.

Pemeliharaan kultur akar adventif umumnya dilakukan dengan metode serial subkultur ke dalam media baru. Pemeliharaan akar adventif bertujuan untuk menjaga stok inokulum yang digunakan dalam berbagai tahapan kultur. Oleh karena itu, subkultur pada media baru perlu dilakukan untuk pemeliharaan multiplikasi akar dan menghindari gangguan senyawa toksik yang terakumulasi dalam media dan wadah kultur (George, 2008). Pada beberapa penelitian disebutkan ada pengaruh perlakuan subkultur terhadap pertumbuhan akar adventif. Choi *et al.* (2000) menyebutkan, subkultur menggunakan media padat memberikan hasil yang lebih baik dibandingkan menggunakan media cair untuk pemeliharaan stok akar adventif *P. ginseng*. Periode siklus subkultur juga mempengaruhi produksi senyawa bioaktif tanaman. Semakin sering dilakukan subkultur, maka produksi metabolit sekunder seperti nikotin, shikonin, ajmalisin, rotenoid, dan antosianin dalam sel tanaman menjadi tidak stabil (Takayama, 2014; Deus-Neumann &

Zenk, 1984). Konsentrasi media Murashige dan Skoog (MS) diketahui sangat berpengaruh terhadap hasil biomassa dan metabolit sekunder dari kultur akar adventif dalam bioreaktor. Fenomena ini dijelaskan dalam penelitian Manuhara *et al.* (2020) pada kultur akar adventif *G. procumbens*. Lee *et al.* (2014) juga melaporkan dalam penelitiannya bahwa penggunaan media MS *half strength* (setengah konsentrasi MS) dalam kultur akar adventif *E. koreanum* menghasilkan biomassa dan kadar *eleutheroside* tertinggi.

Belum ada penelitian optimasi kultur akar *G. procumbens* mengenai efek penggunaan aerasi, densitas inokulum, starter inokulum dalam bioreaktor kapasitas satu 1 L dan 3 L. Penelitian ini melanjutkan penelitian sebelumnya yang telah dilakukan oleh Faizah *et al.* (2018), Manuhara *et al.* (2019; 2020) menggunakan *Balloon Type Bubble Bioreactor* (BTBB) kapasitas 1 L, dan Tahani (2019) menggunakan BTBB kapasitas 3 L dengan *supporting nett*. Selain itu, penelitian ini merupakan yang pertama dalam penerapan kultur akar adventif *G. procumbens* menggunakan bioreaktor pilot plan 19 L. Dalam penelitian ini, optimasi awal kultur akar untuk memperoleh biomassa dan kadar flavonoid optimal dilakukan menggunakan bioreaktor skala laboratorium. Hasil terbaik dari optimasi tersebut selanjutnya digunakan sebagai kontrol perlakuan dalam optimasi kultur akar menggunakan bioreaktor pilot plan. Bioreaktor pilot plan berkapasitas 19 L dikembangkan sebagai instrumen kultur akar yang sesuai untuk memproduksi biomassa akar adventif dengan biaya terjangkau.

Berdasarkan tinjauan di atas, penelitian ini dirancang dengan tujuan menentukan kondisi kultur akar yang optimal untuk peningkatan kapasitas produksi kultur akar adventif *G. procumbens*. Rangkaian penelitian dilakukan dalam dua tahap penelitian yang saling berkelanjutan. Perlakuan variasi laju aerasi, densitas inokulum, dan starter inokulum dari variasi subkultur masing-masing dilakukan pada penelitian tahap pertama menggunakan bioreaktor skala laboratorium. Tahap kedua penelitian dilakukan dengan menggunakan hasil perlakuan optimasi kultur dari penelitian tahap pertama sebagai kontrol perlakuan, sedangkan perlakuan optimasi kultur pada tahap kedua adalah variasi *grade* bahan kimia hara makro media Murashige & Skoog (MS). Dalam penelitian tahap kedua, penggunaan variasi *grade* bahan kimia media kultur yang berbeda untuk mengetahui efeknya terhadap optimasi produksi biomassa dan senyawa bioaktif akar. Sebagai data pendukung, pada tahap penelitian ini juga dianalisa biaya produksi media dengan tujuan mengetahui besaran biaya media untuk kultur akar dalam bioreaktor pilot plan. Oleh karena itu, dilakukan perbandingan terhadap media kultur MS siap pakai (MS instan, CaissonTM) yang dijual umum di pasaran, mengingat media tersebut menggunakan bahan kimia *grade* analisis.

(sesuai label produk) dan harga produk yang cukup mahal. Dengan demikian, dapat diketahui media kultur yang sesuai dengan biaya yang terjangkau untuk produksi biomassa dan senyawa bioaktif akar menggunakan bioreaktor pilot plan. Bioreaktor yang digunakan dalam kedua tahap penelitian ini adalah modifikasi bioreaktor *airlift* dengan model yang berbeda. Tahap pertama penelitian menggunakan bioreaktor model BTBB kapasitas 3 L, sedangkan tahap kedua menggunakan bioreaktor model tabung silindris kapasitas 19 L. Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat menjadi dasar pengembangan metode selanjutnya sehingga diperoleh metode yang optimal untuk produksi biomassa tanaman obat secara *in vitro* guna memenuhi bahan baku obat tradisional.

1.2. Rumusan permasalahan

Untuk mencapai tujuan optimasi produksi biomassa dan metabolit sekunder akar adventif *G. procumbens* menggunakan bioreaktor pada skala laboratorium dan pilot plan. Penelitian ini dirancang untuk menjawab rumusan masalah sebagai berikut :

- 1.2.1 Bagaimanakah pengaruh variasi laju aerasi terhadap biomassa dan kadar flavonoid akar adventif *G. procumbens* yang dikultur dalam bioreaktor skala laboratorium?
- 1.2.2 Bagaimanakah pengaruh variasi densitas inokulum terhadap biomassa dan kadar flavonoid akar adventif *G. procumbens* yang dikultur dalam bioreaktor skala laboratorium?
- 1.2.3 Bagaimanakah pengaruh penggunaan starter inokulum dari variasi subkultur berbeda terhadap biomassa dan kadar flavonoid akar adventif *G. procumbens* yang dikultur dalam bioreaktor skala laboratorium?
- 1.2.4 Bagaimanakah pengaruh variasi *grade* bahan kimia hara makro dan konsentrasi media MS terhadap biomassa dan kadar flavonoid akar adventif *G. procumbens* yang dikultur dalam bioreaktor skala pilot plan ?

1.3. Batasan permasalahan

Batasan permasalahan dalam penelitian ini adalah budidaya akar adventif secara *in vitro* menggunakan dua macam kapasitas bioreaktor. Bioreaktor skala laboratorium merupakan bioreaktor model *Balloon Type Bubble Bioreactor* (BTBB) berkapasitas 3 L, sedangkan bioreaktor pilot plan adalah bioreaktor berkapasitas 19 L yang dikembangkan dengan melakukan modifikasi kapasitas, model, dan penyesuaian sistem kerja bioreaktor dengan acuan dasar bioreaktor sesuai penelitian Paek *et al.* (2001).

1.4. Tujuan penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh beberapa perlakuan optimasi yang digunakan dalam kultur akar adventif *G. procumbens* menggunakan bioreaktor, antara lain :

- 1.4.1 Mengetahui pengaruh variasi laju aerasi terhadap peningkatan biomassa dan kadar flavonoid akar adventif *G. procumbens* dalam bioreaktor skala laboratorium.
- 1.4.2 Mengetahui pengaruh variasi densitas inokulum terhadap peningkatan biomassa dan kadar flavonoid akar adventif *G. procumbens* dalam bioreaktor skala laboratorium.
- 1.4.3 Mengetahui pengaruh penggunaan starter inokulum dari variasi subkultur berbeda terhadap peningkatan biomassa dan kadar flavonoid akar adventif *G. procumbens* dalam bioreaktor skala laboratorium.
- 1.4.4 Mengetahui pengaruh variasi *grade* bahan kimia hara makro dan konsentrasi media MS terhadap peningkatan biomassa dan kadar flavonoid akar adventif *G. procumbens* dalam bioreaktor skala pilot plan.

1.5. Manfaat penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi spesifik terkait budidaya tanaman secara *in vitro* menggunakan teknik kultur akar adventif dalam bioreaktor, meliputi pembuatan desain bioreaktor modifikasi kapasitas 3 L dan 19 L, penanganan bioreaktor, serta keunggulan penggunaan bioreaktor. Selain itu, juga diharapkan memberikan informasi spesifik mengenai faktor-faktor penting optimasi kultur akar adventif dalam aplikasi bioreaktor, meliputi penggunaan laju aerasi, densitas inokulum, asal starter inokulum, dan *grade* bahan kimia hara makro media MS

Penelitian ini adalah yang pertama kali di Indonesia mengaplikasikan bioreaktor pilot plan berkapasitas 19 L sebagai alat produksi akar adventif secara *in vitro*. Hasil pengembangan bioreaktor ini diharapkan dapat menjadi dasar pengembangan alat produksi budidaya tanaman secara *in vitro* secara komersial di Indonesia. Secara umum, hasil penelitian ini diharapkan dapat diaplikasikan secara industrial dalam upaya produksi bahan baku tanaman obat secara *in vitro*, khususnya pada *G. procumbens*.