

Pengaruh Sukrosa dan Polietilen Glikol (PEG) terhadap Kadar Lipid dan Komposisi Asam Lemak pada Kultur Suspensi *Croton tiglium* L.

Arini Putri Hanifa

*Balai Pengkajian Teknologi Pertanian Sulawesi Selatan
Jl. Perintis Kemerdekaan KM.17,5 Sudiang, Makassar*

ABSTRAK

Biodiesel menjadi salah satu bahan bakar alternatif yang banyak dikembangkan untuk mengantisipasi krisis energi. Bahan baku biodiesel dari minyak tumbuhan terkendala oleh keterbatasan produksi biji serta kesesuaian iklim untuk spesies tertentu. Kultur jaringan dapat mengatasi keterbatasan tersebut, antara lain karena sistem produksinya berkelanjutan dan kondisi lingkungan yang dapat dikontrol. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi pengaruh sukrosa dan PEG sebagai agen osmotik terhadap pertumbuhan, kadar lipid, dan komposisi asam lemak pada kultur suspensi *Croton tiglium*. Perlakuan cekaman dilakukan dengan menambahkan berbagai konsentrasi sukrosa (2; 5; 10; 15% w/v) atau PEG (2,5; 5; 7,5; 10% w/v) ke dalam medium. Kadar lipid pada kultur suspensi dilakukan dengan mengukur *Total Lipid Extract* (TLE) berdasarkan berat kering, dilanjutkan dengan analisis komposisi asam lemak menggunakan kromatografi gas. Hasil penelitian menunjukkan bahwa medium MS yang ditambah dengan 1,5 ppm 2,4-D dan 0,3 ppm kinetin menunjukkan respon terbaik untuk induksi kalus *C. tiglium*. Perlakuan sukrosa 10% menghasilkan TLE tertinggi (51%), sedangkan pada perlakuan PEG nilai TLE tertinggi (56,6%) diperoleh pada perlakuan PEG 10% yang teramati pada minggu keenam. Berdasarkan hasil GCMS, pada sel tersuspensi proporsi asam palmitat dan stearat lebih tinggi dibandingkan asam linoleat dan oleat. Proporsi oleat tertinggi (48%) terdapat pada perlakuan sukrosa 10%, sedangkan pada perlakuan PEG 10% proporsi oleatnya 17%. Berdasarkan hasil penelitian ini tampak bahwa cekaman osmotik dengan sukrosa maupun PEG 4000 pada suspensi sel *C. tiglium* mampu menginduksi sintesis minyak secara *in vitro* dan mengubah profil asam lemak.

Kata kunci : asam lemak, *Croton tiglium*, *in vitro*, PEG, sukrosa, TLE,

PENDAHULUAN

Latar Belakang

Krisis bahan bakar fosil saat ini membuat pemerintah mencanangkan pengurangan penggunaan bahan bakar fosil dengan mengembangkan sumber energi alternatif terbarukan. Melalui Peraturan Presiden Republik Indonesia No. 5 tahun 2006 tentang Kebijakan Energi Nasional, telah disusun program pengembangan energi diprioritaskan pada penggunaan energi alternatif sebagai sumber energi dan mengurangi penggunaan minyak bumi. Pada tahun 2025, energi alternatif berupa biofuel ditargetkan menyokong 5% dari target total bauran energi (*energy mix*) nasional (Hambali dkk., 2007). Biofuel atau bahan bakar nabati dikategorikan menjadi empat jenis yaitu : biodiesel, biogas, bioethanol, biokerosen (Soerawidjaja, 2006).

Departemen Energi dan Sumber Daya Mineral menetapkan perlunya evaluasi potensi

sumber daya baru penghasil minyak nabati non pangan (selain jarak pagar). Penggunaan minyak nabati non pangan lebih diutamakan supaya kepentingan pengembangan biodiesel tidak tumpang tindih dengan kepentingan pemenuhan pangan. Azam dkk. (2005) mengkompilasi berbagai tumbuhan penghasil minyak nabati. Sebanyak 75 spesies tumbuhan dinilai berpotensi untuk dikembangkan sebagai biodiesel. Salah satu spesies yang dianggap berpeluang besar sebagai bahan baku biodiesel adalah *Croton tiglium* L.

Biji *C. tiglium* menghasilkan kadar minyak cukup tinggi yaitu 45 % (Hilditch dan William, 1964 dalam Azam dkk., 2005); 50-60% (Soerawidjaja, 2005). *C. tiglium* memiliki angka penyabunan 155,04 mg-KOH/g dan angka iodium 93,71 g-I₂/100 g. Hal ini memenuhi kriteria kualitas minyak berdasar SNI -04-7182-2006 (Hamidi, 2008). *Croton tiglium* L. merupakan tumbuhan asli Asia tropis, yang penyebarannya mulai dari India hingga Papua

Nugini dan Jawa, serta bagian utara Indonesia dan Cina.

Pada umumnya minyak dihasilkan melalui ekstraksi langsung dari biji. Namun produksi minyak dari biji *in vivo* seringkali terbentur dengan kebutuhan lahan yang luas, produksi dan masa berbuah yang terbatas. Sifat totipotensi sel tumbuhan memungkinkan sel yang ditumbuhkan *in vitro* menghasilkan metabolit yang secara alami dihasilkan secara *in vivo*. Produksi metabolit melalui metode kultur jaringan dapat ditingkatkan dengan memanipulasi kondisi kultur. Manipulasi dilakukan dengan cara mengubah berbagai komponen media seperti Zat Pengatur Tumbuh (ZPT), garam mineral dan sumber karbon seperti sukrosa, mannitol atau sorbitol (Al Khayri dan Al Bahrany, 2002) yang menyebabkan cekaman osmotik.

Gula yang berfungsi sebagai sumber karbon dan energi juga dapat bertindak sebagai agen pencekam osmotik (Attree dkk., 1998). Perlakuan cekaman osmotik juga dapat dilakukan dengan penambahan PEG (polietilen glikol). PEG dapat menimbulkan cekaman pada tumbuhan akibat penurunan potensial air dalam media kultur (Lipavska dkk., 2000). PEG menyebabkan potensial air menjadi lebih negatif, menjadikan terbentuknya kondisi kekurangan air (Rains, 1989 dalam Attree dkk., 1998).

Tujuan Penelitian

1. Menentukan zat pengatur tumbuh yang optimum untuk induksi kalus *Croton tiglium*
2. Mengevaluasi pengaruh penambahan sukrosa maupun PEG terhadap pertumbuhan, kadar lipid, dan komposisi asam lemak pada kultur suspensi *C. tiglium*.

METODE PENELITIAN

Pelaksanaan Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Januari 2008 sampai dengan bulan Januari 2009 di Laboratorium Analisis Struktur dan Perkembangan Tumbuhan, Sekolah Ilmu Teknologi Hayati Institut Teknologi Bandung.

Rancangan Penelitian

Penelitian disusun menggunakan Rancangan Acak Lengkap dengan dua perlakuan cekaman yang dilakukan terpisah. Perlakuan cekaman sukrosa yang terdiri dari empat variasi konsentrasi (2 ; 5 ; 10 ; 15% w/v). Perlakuan PEG juga terdiri dari empat

konsentrasi (2,5 ; 5 ; 7,5 ; 10% w/v). Masing-masing perlakuan diulang empat kali. Pengamatan berat kering dan kandungan total lipid dilakukan tiga kali dengan interval dua minggu. Analisis varians dilakukan dengan taraf kepercayaan 95%. Jika terdapat perbedaan nyata maka dilakukan uji lanjutan menggunakan *Duncan Multiple Range Test*.

Cara Kerja

Perkecambahan Biji In Vitro

Biji dicuci di bawah air mengalir selama 15 menit dan dikupas testanya. Biji direndam dalam alkohol 70% selama satu menit, selanjutnya biji direndam dalam larutan natrium hipoklorit 25% (v/v) selama 10 menit dilanjutkan dengan perendaman larutan natrium hipoklorit 10% selama 20 menit. Biji kemudian dibilas dengan menggunakan akuades steril sebanyak tiga kali dan ditanam dalam medium perkecambahan MS ½ tanpa penambahan hormon.

Induksi Kalus

Optimasi zat pengatur tumbuh dalam medium MS dilakukan untuk mendapatkan medium padat terbaik untuk menginduksi kalus dari eksplan. Eksplan berupa hipokotil yang diperoleh dari kecambah *in vitro*, ditanam pada medium MS padat yang telah ditambahkan regulator (zat pengatur tumbuh) dengan berbagai konsentrasi 0 ; 1,5 ; 3 ; 4,5 ppm 2,4-D dan 0 ; 0,15 ; 0,3 ; 0,45 ppm kinetin. Kultur dipelihara dalam rak kultur gelap pada suhu ruangan 25°C selama empat minggu.

Optimasi Zat Pengatur Tumbuh Kultur Suspensi

Berdasarkan hasil optimasi pada induksi kalus, dua kombinasi ZPT yang dengan respon terbaik dicobakan pada kultur suspensi. Konsentrasi gula yang semula 3% (w/v) diturunkan menjadi 2%, dan konsentrasi ZPT pada kultur suspensi diturunkan menjadi 1/5 konsentrasi semula di medium padat. Kultur dengan pertumbuhan terbaik akan digunakan pada perlakuan kultur suspensi dengan cekaman.

Inisiasi Kultur Suspensi

Inisiasi kultur suspensi diawali dengan subkultur kalus meremah dari medium padat ke medium MS cair dengan penambahan sukrosa 2% (w/v) dan kombinasi ZPT hasil optimasi pada tahap sebelumnya. Kultur dipelihara tiga minggu dalam *shaker* pada fotoperiode netral untuk memperoleh stok kultur sel.

Perlakuan Cekaman Sukrosa

Suspensi sel sebanyak 10 mL dari stok kultur sel dipindahkan ke dalam erlenmeyer 100 mL dan ditambahkan 15 mL medium baru sesuai perlakuan

sukrosa, yaitu 2 ; 5 ; 10 ; 15 % (w/v). Kultur dipelihara selama enam minggu di atas *shaker* dengan kecepatan 80 rpm.

Perlakuan Cekaman PEG

Suspensi sel sebanyak 10 mL dipindahkan ke dalam erlenmeyer 100 mL dan ditambahkan 15 mL medium baru sesuai perlakuan PEG : 2,5 ; 5 ; 7,5 ; 10% (w/v). Kultur dipelihara selama enam minggu pada *shaker* dengan kecepatan 80 rpm.

Analisis Total Lipid Extract (TLE)

Total lipid dianalisis dengan menggunakan acuan metode Zou dkk (1995).

Analisis Asam Lemak

Analisis asam lemak dilakukan dengan cara transesterifikasi sampel TLE.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Induksi Kalus

Pertumbuhan kalus mulai terlihat pertama kali pada daerah perlukaan di sekeliling eksplan hipokotil dan kedua ujung potongan hipokotil, yang kemudian meluas dan menutupi permukaan eksplan. Pertumbuhan kalus pada daerah perlukaan disebabkan adanya substansi penginduksi kalus yang sering disebut *wound hormone* atau traumatin (Barlow, 1991). Pembentukan kalus ini juga dikontrol oleh hormon endogen tumbuhan, selain itu zat pengatur tumbuh umumnya ditambahkan untuk menginduksi kalus. Hasil uji optimasi medium untuk induksi kalus menunjukkan bahwa kalus dengan pertumbuhan terbaik diperoleh pada medium MS yang diberi penambahan 2,4-D 1,5 ppm dan kinetin 0,3 ppm.

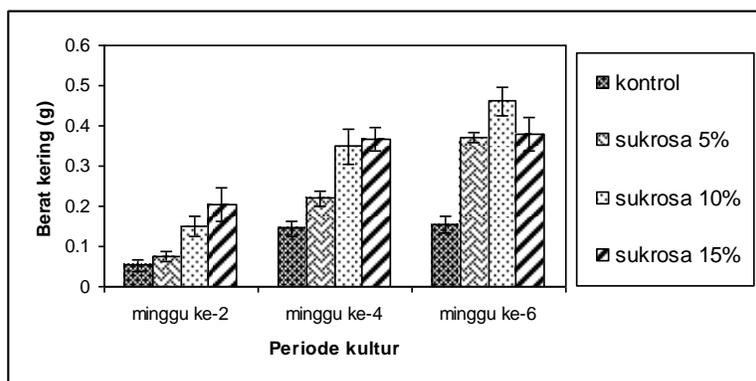
Berdasarkan pengamatan pada berbagai kombinasi ZPT, tampak bahwa 2,4-D lebih dominan perannya dalam hal induksi kalus. Penggunaan 2,4-

D saja tanpa kinetin mampu menginduksi kalus, namun kinetin saja tidak cukup untuk menginduksi kalus. Hal yang serupa juga terjadi pada *Croton urucurana* BAILL Tanpa penambahan zat pengatur tumbuh ini, pembentukan kalus pada eksplan daun tidak terjadi. Auksin sintetik 2,4-D banyak digunakan untuk menginduksi pembentukan kalus, karena salah satu karakteristik utamanya yang dapat meningkatkan aktifitas pembelahan sel (Endress, 1994). Selain auksin, sitokinin juga merupakan hormon yang sering ditambahkan ke dalam medium untuk menginduksi terbentuknya kalus. Penelitian Martin (2009) menunjukkan bahwa 2,4-D dan kinetin merupakan kombinasi zat pengatur tumbuh yang sesuai untuk induksi kalus maupun kultur suspensi *Jatropha curcas*.

Efek cekaman terhadap pertumbuhan kultur

Cekaman dengan sukrosa

Hasil pengamatan terhadap pertumbuhan kultur suspensi *C. tiglium* pada cekaman sukrosa (Gambar 2) menunjukkan terjadi peningkatan berat kering seiring peningkatan konsentrasi sukrosa. Pada konsentrasi sukrosa 15% terjadi penurunan laju pertumbuhan pada minggu ke-6, sedangkan perlakuan lain masih menunjukkan peningkatan pertumbuhan. Perlakuan sukrosa konsentrasi 10% menunjukkan pertumbuhan yang paling baik dan menghasilkan berat kering sel tertinggi pada minggu ke-6, yaitu sebesar 0,461g. Penurunan laju pertumbuhan pada perlakuan sukrosa 15% pada minggu ke-6 diduga karena efek inhibisi, dimana konsentrasi sukrosa yang diberikan tidak lagi mendukung pertumbuhan. Sukrosa konsentrasi tinggi dilaporkan mampu meningkatkan berat kering signifikan pada kalus padi, namun di atas konsentrasi optimum tersebut terjadi penurunan berat kering (Javed dan Ikram, 2008).



Gambar 1. Berat kering sel tersuspensi *Croton tiglium* pada cekaman sukrosa

Peningkatan berat kering sel akibat penambahan sukrosa diduga karena dua hal. Pertama, akibat akumulasi osmolit. Penambahan sukrosa ke dalam medium akan menurunkan potensial air medium, sehingga menyebabkan meningkatnya gradien konsentrasi antara potensial air dalam sel dan medium. Hal ini menyebabkan terjadinya cekaman osmotik. Sel mempertahankan diri dari cekaman osmotik dengan mekanisme penyetaraan osmotik, sehingga dihasilkan osmolit berupa protein, gula, atau senyawa organik lain untuk mempertahankan turgor sel agar tidak terjadi plasmolisis. Akumulasi osmolit berupa prolin dan karbohidrat terlarut berperan dalam peningkatan berat kering sel (Al Khayri dan Al Bahrany, 2002).

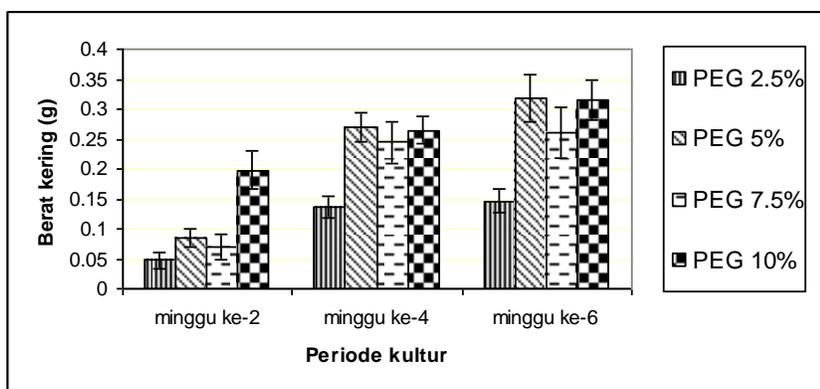
Dugaan kedua tentang peningkatan berat kering akibat tingginya laju sintesis membran baru yang terdiri dari mikrofibril selulosa. Pada metabolisme tumbuhan, sukrosa sebagai sumber karbon dan energi mengalami glikolisis diubah menjadi glukosa-6-pospat, yang merupakan bahan pembentuk selulosa. Amor dkk. (1995) juga menyatakan bahwa peningkatan ketersediaan gula pada sistem kultur *in vitro* mampu meningkatkan sintesis selulosa, yang berujung pada peningkatan berat kering. Hal yang sama juga diungkapkan Gollagunta dkk. (2004), bahwasanya peningkatan konsentrasi sukrosa terkait dengan penyusunan struktur karbohidrat pada dinding sel, yang

merupakan komponen terbesar pada berat kering tumbuhan.

Cekaman dengan PEG

Pada perlakuan cekaman dengan PEG 4000, tercatat adanya peningkatan kering seiring waktu pengamatan (Gambar 2). Pertumbuhan sel pada perlakuan PEG 5% lebih baik daripada perlakuan PEG 7,5%, diduga hal ini dipengaruhi oleh kondisi dari sel yang dikultur tersebut. Perlakuan sukrosa 5% dan 10% memiliki laju pertumbuhan yang hampir sama pada minggu ke-4 dan ke-6. Berat kering sel tertinggi sebesar 0,319g terdapat pada perlakuan PEG 5% pada minggu ke-6, disusul oleh perlakuan PEG 10% dengan berat kering 0,315 g.

PEG dapat menstimulasi kondisi kekeringan, karena pada cekaman dengan PEG potensial air medium menjadi lebih negatif. Sel tumbuhan dapat mengkompensasi kekurangan air dengan mengakumulasi ion aktif dalam apoplas, dan selama periode adaptasi sel mensintesis dan mengakumulasi osmolit organik (Meijer dkk., 1999). Proses tersebut disebut dengan penyetaraan osmotik. Penurunan potensial air sel sehingga lebih rendah dari potensial air eksternal, memungkinkan air untuk bergerak masuk ke sel. Potensial osmotik dalam sel diturunkan akibat akumulasi osmolit di sitoplasma. Pengaturan potensial osmotik dan kompartemensi ion terjadi atas peran gradient elektrokimia proton (Bray, 1993).



Gambar 2. Berat kering sel tersuspensi *Croton tiglium* pada cekaman PEG

Analisis Total Lipid Extract (TLE)

Cekaman dengan sukrosa

TLE merupakan indikator jumlah lipid yang terkandung dalam sel sampel. Kandungan TLE merupakan akumulasi seluruh kelas lipid termasuk

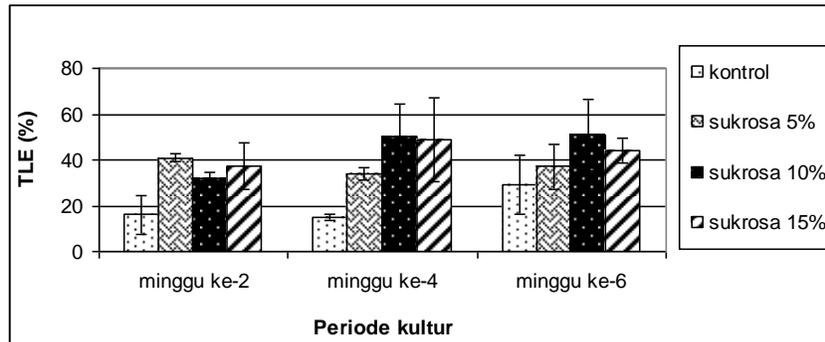
TAG. Berdasarkan analisis statistik, perlakuan sukrosa menunjukkan perbedaan kandungan TLE yang signifikan antara perlakuan dengan kontrol, namun perbedaan nilai TLE tidak berbeda signifikan antar perlakuan (Tabel 1).

Tabel 1. Homogeneous subset TLE perlakuan sukrosa DMRT

SUKROSA	N	Subset	
		1	2
2%	6	20.0000	
5%	6		37.3333
15%	6		43.3833
10%	6		44.3333
Sig.		1.000	.283

TLE pada kultur dengan sukrosa 2% (kontrol) menghasilkan TLE 15-29%, sedangkan perlakuan sukrosa 10% pada minggu ke-6 mampu meningkatkan TLE hingga 51%, yang merupakan perolehan TLE tertinggi, adapun hasil TLE ekstraksi biji berkisar 58% (Gambar 3). Hasil yang

serupa ditunjukkan pada penelitian Avjioglu dan Knox (1989) tentang akumulasi simpanan lipid pada embrio somatik *Brassica napus* menunjukkan bahwa akumulasi simpanan lipid meningkat seiring peningkatan konsentrasi sukrosa yang diberikan.



Gambar 3. Persentase TLE sel tersuspensi *Croton tiglium* pada cekaman sukrosa

Sukrosa sebagai sumber karbon dalam metabolisme mengalami glikolisis yang menghasilkan piruvat, untuk selanjutnya diubah menjadi asetil KoA. Asetil KoA dalam plastid merupakan sumber karbon pada biosintesis asam lemak. Pemecahan pati menjadi glukosa 6 pospat kemudian diubah menjadi dihidroksi aseton pospat akan menghasilkan gliserol 3 pospat. Asam lemak dan gliserol bergabung dan membentuk lipid. Ketersediaan sukrosa diduga membantu tingginya laju proses sintesis lipid.

Cekaman dengan PEG

Pada tumbuhan, lipid memiliki berbagai peran, antara lain sebagai : (1) simpanan energi; umumnya dalam bentuk triasilgliserol, (2) penyusun struktur membran, (3) pelapis permukaan, contohnya ; lilin, kutin, suberin, yang berfungsi mengurangi kehilangan air dan melindungi tumbuhan dari

kerusakan atau masuknya mikroorganisme atau zat kimia berbahaya.

Kekurangan air secara nyata merubah struktur dan fungsi membran, yang terkadang berujung pada kerusakan akibat transisi dari *liquid-crystalline* ke fase gel, dan peningkatan permeabilitas. Hal ini dikarenakan lipid adalah komponen utama membran, secara alami terpengaruh oleh cekaman air. Status fisik dan komposisi membran lipid bilayer sendiri akan mempengaruhi sifat struktural dan fungsional membran (Navari-Izzo, 1989).

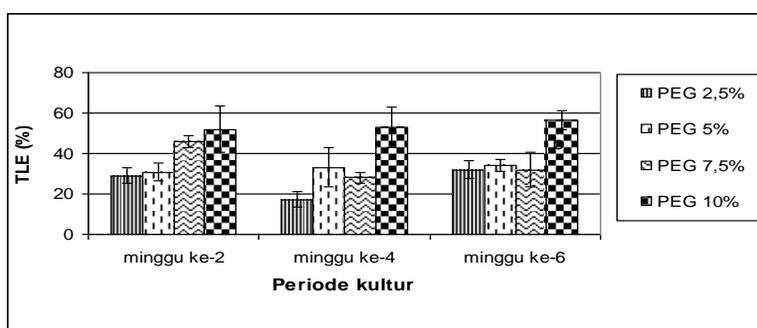
Analisis TLE pada kultur dengan penambahan PEG pada berbagai konsentrasi menunjukkan bahwa PEG berpengaruh signifikan terhadap akumulasi TLE. Uji lanjutan menggunakan DMRT (Tabel 2) menunjukkan bahwa perlakuan PEG 10% memberikan pengaruh terbaik bagi peningkatan TLE.

Tabel 2. Homogeneous subset TLE perlakuan PEG DMRT

PEG	N	Subset		
		1	2	3
PEG 2.5%	6	26.4333		
PEG 5%	6	32.6667	32.6667	
PEG 7.5%	6		35.3333	
PEG 10%	6			53.8167
Sig.		.124	.493	1.000

Perlakuan PEG 10% pada minggu keenam memberikan hasil TLE tertinggi, yaitu 56,6%. Pertambahan periode kultur tidak linier dengan

peningkatan kadar TLE. Hal ini tampak pada minggu ke-4 ada kecenderungan penurunan TLE dibandingkan periode kultur sebelumnya.



Gambar 4. Persentase TLE sel tersuspensi *Croton tiglium* pada cekaman PEG

Membran seluler rentan terhadap cekaman karena bersinggungan langsung dengan pencekam. Lipid merupakan komponen struktural membran seluler. Perubahan kandungan lipid pada membran merupakan hal yang penting terhadap cekaman lingkungan. Hal ini dilakukan untuk mempertahankan fluiditas dan permeabilitas membran (Singh dkk., 2002).

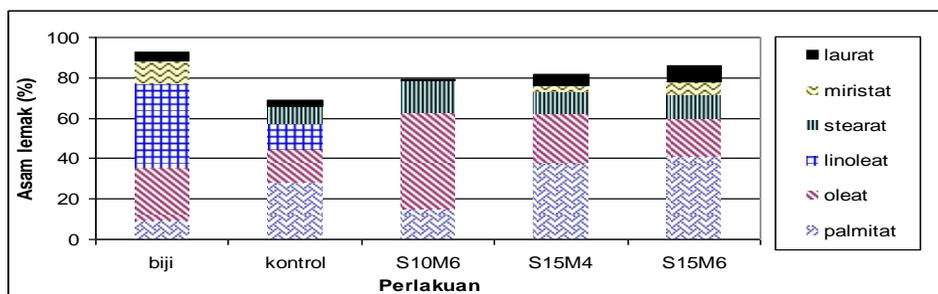
Analisis Asam Lemak

Cekaman dengan sukrosa

Komposisi asam lemak pada minyak *Croton tiglium* terdiri dari asam lemak jenuh maupun tak jenuh. Asam lemak jenuh merupakan asam lemak yang mengandung ikatan tunggal pada rantai hidrokarbonnya, sedangkan asam lemak tak jenuh merupakan asam lemak yang mengandung minimal satu ikatan rangkap pada rantai hidrokarbonnya. Asam lemak jenuh yang mendominasi minyak kroton antara lain : asam kaprat (C10:0), asam miristat (C14:0), asam laurat (C12:0), asam palmitat (C16:0), asam stearat (C18:0), sedangkan asam lemak tak jenuh yang paling umum dijumpai pada minyak kroton adalah asam oleat (C18:1) dan asam linoleat (C18:2) (Gambar 6).

Asam lemak dibentuk dari sukrosa dengan mengubahnya menjadi asetil KoA sehingga C16 dan C18 dapat terbentuk. Hasil ini dapat digunakan untuk pembentukan asam lemak lainnya yang memiliki rantai lebih panjang (C20,C24), sehingga sukrosa pada medium kultur akan menyediakan sumber karbohidrat yang dibutuhkan untuk produksi asam lemak.

Proses pemanjangan maupun desaturasi asam lemak memerlukan keberadaan enzim-enzim spesifik. Sebagai contoh adalah enzim Δ-9 desaturase yang mendesaturasi stearat untuk membentuk oleat. Diduga bahwa pada perlakuan sukrosa 10% enzim-enzim yang dibutuhkan untuk desaturasi terdapat dalam jumlah yang memadai sehingga asam lemak tak jenuh tunggal (oleat) tertinggi diperoleh pada perlakuan sukrosa 10% pada minggu ke-6, dengan proporsi asam oleat 48,3%. Enzim Δ-12 desaturase selanjutnya berperan sebagai katalis pada desaturasi asam oleat menjadi asam linoleat. Pada biji, asam linoleat paling tinggi proporsinya, namun pada kultur suspensi sel asam linoleat sangat menurun. Hal ini diduga karena respon yang berbeda dari sel dan pengaruh keberadaan enzim.

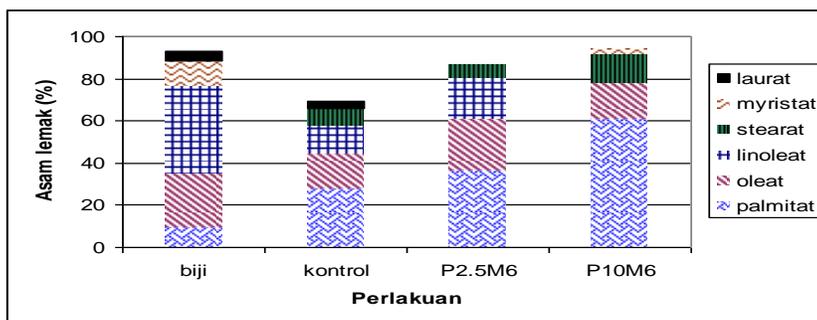


Gambar 5. Komposisi asam lemak pada kultur *Croton tiglium* dengan cekaman sukrosa. S2M2 konsentrasi sukrosa 2%, pengamatan minggu ke-2 S10M6 : konsentrasi sukrosa 10%, pengamatan minggu ke-6; S15M4 : konsentrasi sukrosa 15%, pengamatan minggu ke-4; S15M6 : konsentrasi sukrosa 15%, pengamatan minggu ke-6

Cekaman dengan PEG

Komposisi dan proporsi asam lemak juga berubah pada kultur sel dengan cekaman PEG dibandingkan asam lemak pada biji *in vitro* (Gambar 8). Cekaman PEG pada konsentrasi 2,5% menghasilkan asam oleat sebesar 24,8%, sedangkan pada PEG konsentrasi 10% terdeteksi asam oleat 17,1%. Asam

palmitat meningkat seiring meningkatnya konsentrasi PEG. Penelitian Martin (2009) mengenai induksi minyak pada embrio somatik *Jatropha curcas* menggunakan PEG juga menyebutkan peningkatan asam palmitat pada kultur *in vitro* seiring peningkatan konsentrasi PEG.



Gambar 6. Komposisi asam lemak pada kultur *Croton tiglium* dengan cekaman PEG. P2.5M6 : konsentrasi PEG 2,5% pengamatan minggu ke-6; P10M6 konsentrasi PEG 10% pengamatan minggu ke-6.

Berbagai penelitian menyebutkan bahwa kondisi kekurangan air berpengaruh pada komposisi asam lemak. Cekaman air di lapang dan genotif tanaman mempengaruhi komposisi asam lemak pada minyak bunga matahari. Proporsi asam palmitat meningkat dan asam stearat menurun meski tidak signifikan, sedangkan asam lemak tak jenuh, asam oleat menurun dan asam linoleat meningkat (Petcu dkk., 2001).

Perubahan profil asam lemak juga ditemukan oleh Kumari dkk (2000) yang membandingkan komposisi asam lemak pada embrio zigotik dengan embrio somatik yang disuplementasi dengan senyawa osmotikum seperti sukrosa, PEG

dan ABA. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa manipulasi kondisi kultur menyebabkan perubahan kandungan total lipid dan komposisi membran lipid.

Kaitan Asam Lemak dengan Biodiesel

Komponen asam lemak merupakan faktor yang penting dipertimbangkan untuk kelayakan minyak menjadi biodiesel karena berbagai parameter penting secara langsung dipengaruhi oleh komposisi asam lemak, misalnya angka setana, viskositas kinematik, stabilitas oksidatif, dan titik awan (Knothe, 2008). Karakteristik struktural molekul ester lemak yang mempengaruhi parameter biodiesel

adalah panjang rantai, tingkat kejenuhan dan percabangan rantai. Rantai yang panjang dan tidak bercabang akan menghasilkan angka setana yang tinggi. Ketidakejenuhan asam lemak akan menurunkan angka setana dan menjadikannya lebih labil terhadap oksidasi karena keberadaan ikatan rangkap. Pada asam lemak jenuh memiliki titik awan yang tinggi dan viskositas tinggi. Hal ini tidak menguntungkan untuk biodiesel karena menyebabkan penggumpalan (Knoethe, 2005). Berdasarkan hal tersebut, persyaratan biodiesel menjadi antagonistik antar parameter, sehingga tidak ada profil asam lemak yang benar-benar sempurna untuk menjadi biodiesel agar semua parameter terpenuhi. Walaupun demikian kadar asam lemak tak jenuh tunggal seperti oleat atau palmitoleat yang lebih tinggi dan asam lemak jenuh dan asam lemak tak jenuh ganda yang lebih rendah dianggap mendekati kesesuaian untuk menjadi bahan utama biodiesel. Analisis asam lemak dengan GCMS menunjukkan bahwa komposisi asam lemak yang paling mendekati kriteria biodiesel dihasilkan pada perlakuan sukrosa 10% minggu ke-6. Pada perlakuan tersebut dihasilkan asam oleat tertinggi (48%), dengan proporsi asam lemak jenuh yang rendah.

Penelitian ini menunjukkan potensi produksi minyak-lemak melalui metode kultur *in vitro*. Manipulasi dapat dilakukan untuk meningkatkan akumulasi lipid dan sintesis asam lemak yang diinginkan. Nilai TLE yang diperoleh hampir menyamai TLE biji *in vivo*, namun komposisi asam lemak pada kultur *in vitro* dengan cekaman belum memperlihatkan *trend* (pola) yang pasti dalam pembentukan asam lemak.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

1. Medium MS yang ditambah 1,5 ppm 2,4-D dan 0,3 ppm kinetin merupakan medium terbaik untuk induksi kalus *Croton tiglium*.
2. Penambahan sukrosa maupun PEG meningkatkan kadar lipid pada kultur suspensi *C. tiglium*, dengan kadar lipid tertinggi diperoleh pada perlakuan sukrosa 10% dan PEG 10%.
3. Sukrosa maupun PEG mengubah komposisi asam lemak pada kultur suspensi *C. tiglium*.

Saran

1. Optimasi TLE dengan pemberian cekaman pada kultur embrio somatik dan dilakukan pengamatan kuantitatif terhadap kadar TAG.
2. Perlakuan cekaman dengan mengkombinasikan sukrosa dan PEG.

DAFTAR PUSTAKA

- Al Khayri, J.M., dan Al Bahrany, A.M.2002 : Callus growth and proline accumulation in response to sorbitol and sucrose induced osmotic stressing Rice, *Biol. Plant*, **45**, 609-611.
- Amor Y., Haigler C.H., Wainscott M., Johnson S., dan Delmer D.P.1995 : A membrane associated form of sucrose synthase and its potential role synthesis of cellulose and callose in plants, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **92**, 9353-9357.
- Attree, S.M., Ilic-Grubor, K., Fowke, L.C.1998 : Induction of microspore-derived embryos of *Brassica napus* L. with polyethylene glycol (PEG) as osmoticum in a low sucrose medium, *Plant Cell Reports*, **17**, 329-333.
- Avjioglu, A., dan Knox, R.B.1989 : Storage lipid accumulation by zygotic and somatic embryos in culture, *Annals of Botany*, **63**, 409-420.
- Azam, M.M., Waris A., dan Nahar N.M.2005 : Prospects and potential of fatty acid methyl esters of some non traditional seed oils for use as biodiesel in India, *Biomass & Bioenergy*, **129**, 293-302.
- Barlow, P.W., D. Bray, P.B. Green, dan Slack, J.M.W.1991 : Pattern Formation in Plant Tissues, Cambridge University Press, Cambridge.
- Bray, E.A.1993 : Molecular response to water deficit. *Plant Physiol*, **103**, 1035-1040.
- Endress, R.1994 : *Plant Cell Biotechnology*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Gollagunta, V., Adelberg, J.W., Rieck, J., dan Rajapakse, N. 2004 : Sucrose concentration in liquid media affects soluble carbohydrates, biomass and storage quality of micropropagated hosta. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **77**, 125-131.
- Hambali, E., Mujdalipah, S., Tambunan, A.H., Pattiwiri, A.W., Hendroko, dan Roy, R. 2007 : *Teknologi Bioenergi*, Agromedia, Jakarta.
- Hamidi, A.2008 : *Analisis Potensi Croton tiglium* L.

- dan *Ricinus communis* L. sebagai Bahan Baku Biodiesel Berdasarkan Produktivitas dan Analisis Kimia Minyak, Skripsi Sarjana, Institut Teknologi Bandung.
- Javed, F., dan Ikram, S. 2008. Effect of sucrose induced osmotic stress on callus growth and biochemical aspects of two wheat genotypes, *Pak. J. Bot.*, **40**, 1487-1495.
- Knoethe, G. 2005 : Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters, *Fuel Processing Technology*, **86**, 1059-1070.
- Knoethe, G. 2008 : "Designer" Biodiesel: Optimizing Fatty Ester Composition to Improve Fuel Properties, *Energy & Fuels*, **22**, 1358-1364.
- Kumari, A., Cheemaa, G.S., dan Munshi, S.K. 2000 : A Hypocotyl-derived somatic embryogenic system in *Brassica juncea* Czern & Coss and its manipulation for enhanced storage lipid accumulation, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **63**, 109-120.
- Lipavska, H., Svobodova, H., Albrechtova, J., Kumstyrova, L., Vagner, M. dan Vondrakova, Z. 2000 : Carbohydrate status during somatic embryo maturation in Norway spruce, *In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant*, **36**, 260-267.
- Martin, A.F. 2009: Induksi dan Analisis Kadar Minyak Nabati Serta Protein Oleosin Pada Sel Embriogenik Jarak (*Jatropha curcas* L.), Tesis Magister, Institut Teknologi Bandung.
- Meijer, H.J.G., Divecha, N., Van den Ende, H., Musgrave, A., Munnik, T. 1999: Hyperosmotic stress induces rapid synthesis of phosphatidyl-D-inositol 3,5-bisphosphate in plant cells, *Planta*, 208: 294-298.
- Navari-Izzo, F, Quartacci, M.F., dan Izzo, R. 1989 : Lipid changes in maize seedlings in response to field water deficits. *J. of Exp. Bot.*, **40**, 675-680.
- Petcu, E., Arsitecu, A., dan Stanciu, D. 2001 : The effect of drought stress on fatty acid composition in some Romanian sunflower hybrids. *Romanian Agricultural Research*, **15**, 39-42.
- Singh, S.C., Sinha., R.P., dan D.P., Hader. 2002 : Role of lipids and fatty acids in stress tolerance in cyanobacteria. *Acta Protocol*, **41**, 297-308.
- Soerawidjaja, T.G., Brojonegoro T.P, Reksowardojo I.K. 2005 : *Prospek, Status dan Tantangan Penegakan Industri Biodiesel di Indonesia*. Kelompok Riset Biodiesel, ITB.
- Soerawidjaja, T.H. 2006 : Fondasi ilmiah dan keteknikan dari teknologi pembuatan biodiesel. Disampaikan pada *Seminar Nasional " Biodiesel sebagai energi alternatif masa depan."* Yogyakarta, 15 April 2006.
- Zou, J., Abram, G.D., Barton, D.L., Taylor, D.C., Pomeroy, M.K., dan Abrams, S.R. 1995 : Induction of lipid and oleosin biosynthesis by abscisic acid and its metabolites in microspore-derived embryos of *Brassica napus*, *Plant Physiol.*, **108**, 563 - 571.