

VALIDASI METODE ANALISIS ZEATIN MENGGUNAKAN TEKNIK *ULTRA HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY* (UHPLC) SEBAGAI INSTRUMEN STUDI KULTUR *IN VITRO* KELAPA SAWIT (*Elaeis guineensis* Jacq.)

VALIDATION OF ZEATIN ANALYSIS METHOD USING *ULTRA HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY* (UHPLC) TECHNIQUE ON OIL PALM (*Elaeis guineensis* Jacq.) *IN VITRO* CULTURE STUDY.

Arfan Nazhri Simamora, Diny Dinarti^{1*} dan Sudarsono Sudarsono¹

Abstrak Analisis kuantitatif fitohormon zeatin dibutuhkan untuk mengetahui korelasi antara respon pembentukan kalus maupun embrio dengan keberadaan zeatin itu sendiri pada jaringan eksplan serta interaksi antara zeatin yang terdapat pada jaringan eksplan dengan zat pengatur tumbuh sintetis yang ditambahkan pada media kultur *in vitro* kelapa sawit. Penelitian ini dilakukan untuk memperoleh metode analisis kandungan zeatin yang mudah dan cepat untuk direproduksi sehingga dapat diaplikasikan pada kajian-kajian penelitian fitohormon, terutama zeatin. Analisis dilakukan menggunakan *ultra-high performance liquid chromatography* (UHPLC) dengan kolom C18 dan fase gerak 100% metanol (MeOH) secara isokratik serta laju alir 0.2 mL/menit dengan detektor UV $\lambda = 280$ nm. Eksplan yang dianalisis berasal dari individu yang mewakili varietas La Me, Avros, PPKS 239 dan Simalungun. Hasil uji kesesuaian sistem menunjukkan bahwa metode memenuhi syarat untuk digunakan untuk analisis dengan nilai rerata standar deviasi parameter $RSD \leq 2$. Validasi metode memberikan hasil kurva kalibrasi dengan nilai koefisien determinasi $r^2 = 0,9996$ dan presisi instrumen dan metode dengan standar deviasi relatif masing-masing sebesar 0,56 dan 1,03. Diperoleh nilai LoD dan LoQ masing-masing sebesar 2,457 ppm dan 7,446 ppm.

Kata kunci: zeatin, UHPLC, metode, validasi, kultur *in vitro*

Abstract Quantitative analysis of zeatin is needed to determine correlation between callus and embryo formation with the presence of zeatin itself on explant and interaction between zeatin content on explant and synthetic plant growth regulators (PGRs) which is added to oil palm *in vitro* culture media. This research was conducted to obtain method of zeatin content analysis that is easy and fast to reproduce, so it can be applied to research studies on phytohormones, especially zeatin. The analysis was carried out using *ultra high performance liquid chromatography* (UHPLC) with C18 column and isocratically 100% methanol mobile phase and 0.2 mL / minute flow rate with UV detector at length $\lambda = 280$ nm. Analyzed explants were taken from individuals representing La Me, Avros, PPKS 239 and Simalungun varieties. Results of system suitability test indicated that the method fulfilled its requirements to be used for analysis with relative standard deviation (RSD) value was ≤ 2 . Method validation gave results of calibration curve with the coefficient of determination $r^2 = 0,9996$ and precision of instrument and method obtained relative standard deviation by 0,56 and 1,03, respectively. LoD and LoQ values obtained were 2,457 ppm and 7,446 ppm respectively.

Keywords: zeatin, UHPLC, method, validation, *in vitro* culture

Penulis yang tidak disertai dengan catatan kaki instansi adalah peneliti pada Pusat Penelitian Kelapa Sawit

Diny Dinarti (✉)

¹Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor (IPB University)
Email: dinydinarti@gmail.com

PENDAHULUAN

Kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) merupakan komoditas dengan tingkat produksi dan konsumsi terbesar di Indonesia. Diproyeksikan pada tahun 2021 jumlah produksi mencapai 38,85 juta ton dengan ekspor sebesar 24,58 juta ton dan konsumsi domestik mencapai 13,99 juta ton (Pusdatin 2017). Selain untuk konsumsi, kelapa sawit juga dimanfaatkan sebagai bahan baku industri dan sumber energi. Sekitar 20% produksi kelapa sawit terutama minyak intinya digunakan untuk kebutuhan non-pangan seperti kosmetik, deterjen, plastik dan lain sebagainya (World Growth 2011). Jumlah kalori yang dihasilkan kelapa sawit hampir 4 kali lebih tinggi dibanding kedelai untuk hasil dari luasan areal pertanaman yang sama (MacDonald *et al.*, 2015) dan jumlah karbon residunya lebih baik dari batu bara sub-bituminus (Loh 2016) sehingga cocok digunakan sebagai sumber energi alternatif.

Perbanyakan klonal kelapa sawit melalui kultur *in vitro* merupakan pendekatan yang berpotensi untuk dikembangkan, mengingat bahan tanaman asal klon mampu menghasilkan tandan buah segar mencapai 20 – 25% (Harahap *et al.*, 2010) dan CPO 13% lebih tinggi dibanding kelapa sawit asal perbanyakan biji. Kelemahan perbanyakan kelapa sawit secara *in vitro* yaitu rendahnya laju embriogenesis (3% – 6%) (Kushairi *et al.*, 2010) dan laju embriogenesis yang bervariasi tergantung dari genotipe sumber eksplannya (Nugroho *et al.*, 2014). Pemberian auksin yang berbeda juga menghasilkan respon induksi kalus yang berbeda antar genotipe sumber eksplan (Jayanthi *et al.*, 2015).

Formulasi media induksi kalus maupun embrio umumnya bersifat *trial-error* dan kajian melalui pendekatan genotipe maupun fitohormon yang terkandung pada eksplan dan korelasinya dengan laju kalogenesis maupun embriogenesis belum banyak dilakukan. Kajian korelasi fitohormon dan genotipe terhadap laju kalogenesis dan embriogenesis pernah dilakukan, di antaranya pada kultur jelai (Hisano *et al.*, 2016) dan kohlrabi/lobak Jerman (Cosic *et al.*, 2015).

Zeatin merupakan salah satu jenis sitokinin yang umum dan paling banyak disintesis pada tumbuhan dan secara terbatas berperan dalam regulasi transisi dari fase Gap2 menuju mitosis pada siklus pembelahan sel (Roef dan Van Onckelen 2010). Konfigurasi zeatin biasanya dalam bentuk *trans* dan

cis, di mana *trans*-Zeatin (tZ) merupakan zeatin yang aktif berperan dalam kegiatan sel sedangkan *cis*-Zeatin (cZ) hanya aktif pada bagian tertentu saja (Gajdosova *et al.*, 2011). Pada Arabidopsis, pengamatan terhadap interaksi reseptor dengan ligan menunjukkan bahwa aktivitas cZ jauh lebih rendah dibandingkan dengan tZ (Heyl *et al.*, 2012). Zhang *et al.* (2013) menemukan bahwa sitokinin terlibat dalam regulasi pembelahan sel di bagian *quiescent center* akar dengan menekan ekspresi dari gen pendistribusi auksin *LAX2*. Sitokinin bersama-sama dengan auksin secara dinamis berinteraksi dan terkadang berperan secara unik dengan saling mendukung atau menghambat pada proses perkembangan sel (Davies *et al.*, 1995; Schaller *et al.*, 2015; Jain dan Nakhoda 2017).

Analisis kuantitatif sitokinin yang terkandung di dalam eksplan dibutuhkan untuk memonitor tingkat konsentrasi sitokinin pada fase-fase perkembangan kultur seperti misalnya pada kalus atau embrio. Ooi *et al.* (2013) melaporkan bahwa total level konsentrasi sitokinin meningkat secara bertahap seiring fase perkembangan kultur pada kultur *in vitro* kelapa sawit asal klon normal dan mantel. Level sitokinin juga cenderung rendah pada tahap kalogenesis dan pemberian auksin secara eksternal untuk menstimulasi embriogenesis mungkin menekan biosintesis sitokinin (Moubayidin *et al.*, 2009). Berdasarkan hal ini perlu dilakukan analisis kuantitatif terhadap tingkat konsentrasi sitokinin pada fase-fase kultur tertentu. Hal ini mungkin dapat dijadikan sebagai gambaran interaksi antara sitokinin endogen dengan ZPT sintesis yang ditambahkan pada jenis media untuk fase kultur tertentu.

Metode analisis kandungan sitokinin telah banyak dilakukan. Prosedur ekstraksi umumnya melibatkan berbagai jenis pelarut seperti air, metanol, etil asetat, larutan Bielski dan sebagainya (Bai *et al.*, 2010). Metanol (MeOH) adalah pelarut yang umum digunakan dalam jumlah terbesar pada ekstraksi fitohormon dari bahan segar atau kering. Dihasilkan ekstrak fitohormon tertinggi seperti misalnya pada jewawut dengan MeOH 100% (Nakurte *et al.*, 2012), Arabidopsis dengan MeOH : air (7 : 3) (Trapp *et al.*, 2014), *Sargassum horneli* dengan MeOH : air : asam metanoat (15 : 4 : 1) (Li *et al.*, 2016) dengan separasi menggunakan kolom C18. Demikian juga halnya dengan ekstraksi pada cabai dan gandum, dimana digunakan MeOH 80% dengan separasi pada kolom

C18 (Chen *et al.*, 2017). Kolom C8 atau C18 yang kurang polar disarankan untuk digunakan pada separasi dari sampel segar yang bersifat umumnya netral (mengandung kedua ion positif dan negatif) (Synder *et al.*, 2010). Selain itu, kolom C18 dikenal sangat efisien memisahkan lemak dan beberapa pigmen daun (Fu *et al.*, 2011).

Prosedur ekstraksi sekaligus purifikasi menggunakan metode *liquid-liquid extraction* (LLE) seperti yang dilakukan Muller dan Munne-Bosch (2011) cenderung lebih mudah untuk dilaksanakan terutama di laboratorium-laboratorium dasar. Metode analisis fitohormon yang telah dipublikasi sering menggunakan standar internal berlabel isotop yang mungkin cukup rumit untuk direproduksi, sehingga penggunaan standar eksternal lebih mudah untuk dilaksanakan.

Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh metode analisis kandungan zeatin yang optimum, cepat dan mudah untuk direproduksi sehingga dapat diaplikasikan pada kajian-kajian penelitian yang melibatkan analisis fitohormon pada tumbuhan. Metode ini diharapkan mampu mengekstraksi dan mengidentifikasi zeatin baik secara kualitatif maupun kuantitatif dari bahan sampel segar yang umumnya mengandung banyak komponen lainnya seperti misalnya protein, lemak, klorofil, jenis fitohormon lainnya (IAA, BA) dan sebagainya. Metode yang akan dipilih merupakan metode yang mampu menghasilkan puncak area yang sesuai standar nilai uji kesesuaian sistem dan validasi serta memiliki nilai *RSD* (*relative standard deviation*) yang kecil. Nilai *RSD* yang kecil menunjukkan konsistensi metode maupun alat dalam menghasilkan luaran analisis untuk sampel segar yang diuji. Selain itu, kemudahan dalam pengerjaan analisis seperti ekstraksi dan persiapan alat kromatografi juga menjadi pertimbangan dalam memilih metode yang digunakan.

BAHAN DAN METODE

Metode Ekstraksi

Metode ekstraksi zeatin yang digunakan merupakan metode yang dikembangkan Muller dan Munne-Bosch (2011) tanpa penambahan standar internal dan sonikasi. Potongan daun segar dari gelendong daun muda kelapa sawit varietas La Me, Avros, Simalungun dan PPKS 239 (masing-masing

satu individu per varietas) dan potongan daun yang mewakili setiap area atau topofisis gelendong daun (pangkal, tengah dan ujung) ditimbang sebanyak 50 mg dan dimasukkan ke *microtube* 2 ml bersama dengan *tungsten bead* dan diberi pelarut berupa campuran MeOH (Merck, LiChrosolv® : 1060181000) : isopropanol (Merck, EMSURE® : 1096341000) : asam asetat glasial (Merck, EMSURE® : 1000631000) dengan rasio 60 : 39 : 1 (v/v) sebanyak 200 µL. Sampel kemudian dihaluskan menggunakan TissueLyser II (Qiagen) dengan frekuensi 30 Hertz selama 3 menit. Sampel dibalik kemudian dihaluskan lagi selama 2 menit. Sampel sedikit digoyang lalu didiamkan selama 15 menit. Selanjutnya sampel disentrifugasi (Thermo Scientific) selama 15 menit dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 40 C. Supernatan yang diperoleh kemudian dipindahkan ke *microtube* 2 ml yang baru sebagai tempat pengumpulan ekstrak. Kemudian ditambahkan kembali pelarut sebanyak 100 µL. Setelah digoyang-goyang selama 15 menit, sampel kembali disentrifugasi selama 15 menit. Supernatan kemudian dipindahkan ke *microtube* pengumpul ekstrak. Ekstraksi dilakukan sebanyak 5 kali dan seluruh ekstrak yang terkumpul disentrifugasi selama 5 menit dan supernatan dipindahkan ke *microtube* baru.

Penentuan sistem UHPLC

Larutan standar zeatin (PhytoTechnology Laboratories : Z125) diinjeksi ke UHPLC (Acquity, Waters) dan pembentukan kromatogramnya dibandingkan. Perlakuannya adalah rasio penggunaan larutan fase gerak (*mobile phase*) dan tipe kolom yaitu metanol (MeOH) : air (90 : 10) dan (100 : 0) pada kolom Acquity UHPLC BEH C18 Waters (C18 (90 : 10), C18 (100 : 0)) dengan laju alir 0,2 mL/menit (50 mm x 2.1 mm, 1.7 µm) serta MeOH : air (100 : 0) pada kolom dengan Partisil™ 10 SCX Whatman (250 mm x 4.6 mm, 10µm) (SCX (100 : 0)) dengan laju alir 0,8 mL/menit secara isokratik. Digunakan kondisi dengan suhu kolom 30°C dan detektor UV $\lambda = 280$ nm.

Uji kesesuaian sistem dan validasi

Sampel berupa larutan standar zeatin diinjeksi sebanyak 3 µL ke UHPLC dan diulang sebanyak 6 kali untuk masing-masing perlakuan. Selanjutnya dari data

kromatogram yang terbentuk dihitung nilai peubah berupa faktor ikutan (*tailing factor*), K prime (*capacity/retention factor*), nilai N (lempeng teoritis) dan HETP (*height equivalent to theoretical plate*). Nilai peubah perlakuan yang sesuai dengan rekomendasi *U.S Federal Drug Administration (FDA)* (1994) atau Synder *et al.* (2010) dan memiliki standar deviasi relatif (*relative standard deviation, RSD*) ≤ 2 akan dipilih sebagai sistem yang digunakan untuk selanjutnya divalidasi.

Kurva validasi/kalibrasi dibentuk melalui pembacaan area puncak yang dihasilkan dari injeksi larutan standar zeatin dengan pelarut metanol sebanyak 8 konsentrasi (15,5 – 124 ppm). Selanjutnya dihitung *slope*, *intercept* dan koefisien determinasi dari kurva yang terbentuk.

Nilai persentase perolehan kembali dihitung dari nilai konsentrasi zeatin yang dihasilkan dari ekstraksi sampel segar potongan daun muda kelapa sawit dengan penggunaan pelarut blanko dan pelarut yang telah ditambahkan standar zeatin sebanyak 200 ppm. Sampel segar diambil dari individu dan bagian yang sama agar diperoleh data konsentrasi zeatin yang relatif sama. Selanjutnya hasil ekstrak diinjeksi ke UHPLC dan dihitung persentase perolehan kembali (*% recovery*) yang dinyatakan sebagai akurasi. Persentase perolehan kembali yang direkomendasikan pada sampel segar yaitu sebesar 80% – 120% dengan *RSD* $\leq 15\%$ (Synder *et al.*, 2010).

Larutan standar zeatin dibuat sebanyak 8 kali pada konsentrasi yang sama kemudian diinjeksi secara duplo ke UHPLC. Selanjutnya nilai area yang dihasilkan dari kromatogram yang terbentuk dihitung nilai simpangan baku relatifnya (*RSD*). Nilai *RSD* yang dihasilkan dari pembacaan nilai area kromatogram yang dibentuk dari injeksi standar zeatin disebut sebagai nilai presisi pembacaan instrumen. Di lain pihak, nilai presisi metode dihitung berdasarkan pembacaan nilai area kromatogram zeatin dari injeksi sampel hasil ekstraksi potongan daun (sampel segar) dari setiap individu varietas maupun topofisis. Nilai area yang dihasilkan selanjutnya dihitung nilai *RSD*-nya untuk setiap sampel yang mewakili individu dan topofisis. Rerata nilai *RSD* pembacaan kromatogram sampel segar digunakan sebagai nilai pembacaan presisi metode analisis. Nilai *RSD* yang dapat diterima adalah $\leq 2\%$

untuk injeksi sejumlah $n \geq 5$ (USP 2016).

Batas deteksi (*Limit of Detection, LoD*) dihitung dengan nilai simpangan baku residual (*standard error, SE*) dikali 3,3 dan dibagi dengan nilai kemiringan (*slope*) (*a*) pada persamaan regresi kurva kalibrasi $Y = aX + b$. Batas kuantifikasi (*Limit of Quantification, LoQ*) dihitung dengan nilai SE dikali 10 dan dibagi dengan nilai *slope*-nya.

Nilai konsentrasi zeatin setiap sampel genotipe/varietas dan topofisis daun kelapa sawit dihitung menggunakan persamaan ($Y = aX + b$) yang dihasilkan dari pembentukan kurva validasi/kalibrasi. Nilai area kromatogram yang dihasilkan dari setiap sampel dinyatakan sebagai Y dengan X adalah konsentrasi zeatin sampel (ppm). Selanjutnya dilakukan analisis ragam untuk data konsentrasi zeatin yang diperoleh. Apabila berbeda nyata dilakukan uji lanjut Duncan (*DMRT*) dengan $\alpha = 0,05$.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Metanol merupakan jenis pelarut yang secara luas digunakan dalam ekstraksi fitohormon karena memiliki ukuran partikel yang kecil dan berat molekul yang rendah sehingga mudah mempenetrasi sel tumbuhan (Fu *et al.*, 2011). Metanol yang telah diasamkan (biasanya ditambahkan asam metanoat atau asam asetat) umumnya digunakan sebagai larutan ekstraksi maupun fase gerak (*mobile phase*) untuk meningkatkan polaritasnya pada analisis HPLC. Namun, Hou *et al.* (2008) menemukan bahwa penggunaan metanol tanpa penambahan asam metanoat pada analisis HPLC menghasilkan kemampuan elusi fitohormon yang lebih kuat.

Hasil uji rasio fase gerak MeOH : air dan tipe kolom (Tabel 1) menunjukkan bahwa penggunaan fase gerak MeOH 90% maupun 100% menggunakan kolom C18 menghasilkan nilai *RSD* 1,96 dan 1,87 (*RSD* ≤ 2), sedangkan perlakuan MeOH 100% dengan kolom Partisil SCX menghasilkan nilai *RSD* 2,04 (*RSD* > 2). Nilai *RSD* menunjukkan seberapa akurat dan presisi data yang dihasilkan dari metode dan instrumen yang digunakan. Semakin kecil nilai *RSD*-nya semakin baik (FDA 1994). Penggunaan fase gerak dengan MeOH 100% lebih dipilih karena kemudahan penggunaannya. Namun demikian, nilai N untuk kolom C18 dengan fase gerak metanol

100% belum memenuhi nilai yang direkomendasikan ($N > 2000$). Sebaliknya, penggunaan fase gerak MeOH 100% dengan kolom Partisil mampu menghasilkan nilai lempeng teoritis lebih besar dari yang direkomendasikan ($N > 2000$). Nilai N menunjukkan tingkat efisiensi kolom untuk membentuk puncak kromatogram dalam setiap

satuan unit *run-time* (FDA 1994). Umumnya, semakin tinggi nilai N , maka resolusi kromatogram yang dihasilkan semakin baik, namun membutuhkan waktu retensi yang lebih lama. Besaran nilai N dapat disesuaikan sebagai kompromi dalam capaian untuk meningkatkan resolusi atau *run-time* yang lebih pendek (Synder *et al.*, 2010).

Tabel 1. Hasil uji perlakuan rasio MeOH : air dan tipe kolom dalam analisis zeatin menggunakan Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC)

Table 1. Result of MeOH : water ratio and column type treatments for zeatin analysis using suitability test for zeatin analysis using Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC)

Peubah pengamatan	Tipe kolom (MeOH : air)		
	C18 (90 : 10)	C18 (100 : 0)	Partisil SCX (100 : 0)
Waktu retensi (min)	0.684	0.646	3.563
Lebar @tangent	0.079	0.064	0.243
Lempeng teoritis (N)	1173.069	1625.109	3450.744
HETP (cm)	4.26E-04	3.08E-04	1.45E-04
K Prime (<i>Retention factor, k</i>)	5.841	5.465	34.631
<i>Tailing Factor, TF</i>	1.218	1.856	1.004
RSD (%)	1.96	1.87	2.04

Penggunaan sampel segar yang sering kali memiliki banyak matriks, mengharuskan waktu kontak yang seimbang antara fase gerak dengan kolom yang ditunjukkan oleh nilai K Prime (*capacity/retention factor, k*) (Synder *et al.*, 2010). FDA (1994) merekomendasikan nilai $k > 2$ dan Synder *et al.* *et al.* (2010) merekomendasikan nilai $2 < k \leq 10$ agar kromatogram yang dihasilkan lebih sempit dan tinggi serta memiliki waktu retensi yang singkat sehingga meningkatkan kemampuan deteksinya. Dalam evaluasi ini, semua perlakuan dengan kolom C18 memberikan nilai $2 < k \leq 10$ dan lebih besar dari 10 untuk kolom Partisil SCX (Tabel 1). Contoh tampilan kromatogram hasil analisis UHPLC disajikan pada Gambar 1. Gambar 1a dan 1b menunjukkan kromatogram yang sempit dan tinggi serta cenderung simetris. Selain itu, analit juga terdeteksi secara jelas yang ditunjukkan dengan nilai absorbansi (*absorbance unit, AU*) yang cukup tinggi yang juga menunjukkan nilai rasio *signal to noise* (S/N) yang tinggi. Sedangkan sampel yang dilewatkan pada kolom Partisil SCX (1c) tidak menghasilkan

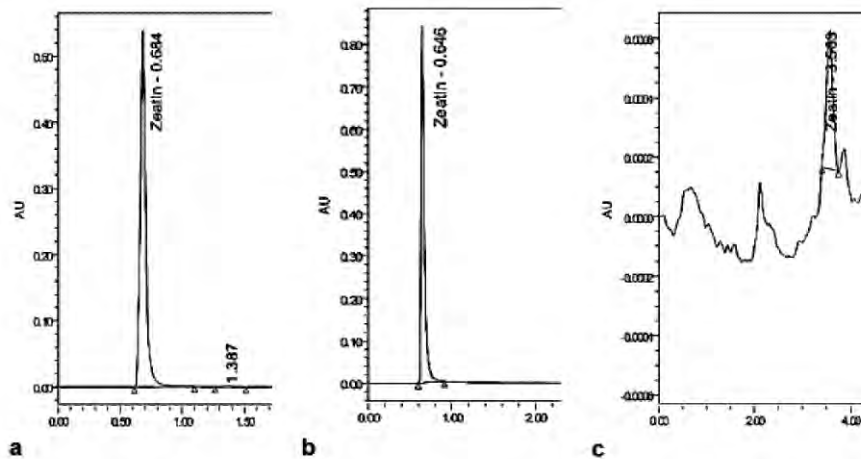
kromatogram yang terabsorbansi dengan baik dan mungkin memiliki rasio *signal to noise* (S/N) yang rendah.

Faktor ikutan (*tailing factor, TF*) merupakan nilai yang menunjukkan kesimetrisan kromatogram yang dihasilkan yang dapat mempengaruhi akurasi saat kuantifikasi (FDA 1994). Nilai yang direkomendasikan yaitu $TF \leq 2$ (FDA 1994; Synder *et al.*, 2010; USP 2016). Nilai TF yang dihasilkan dari perlakuan kolom C18 dan Partisil SCX lebih kecil dari 2 sehingga apabila merujuk kepada faktor TF , semua perlakuan memenuhi nilai yang direkomendasikan.

Pada prinsipnya, tipe kolom dan fase gerak yang digunakan dalam analisis kromatografi cair merupakan pilihan yang diserahkan kepada masing-masing analis berdasarkan tujuan analisis yang dilakukan. Bagaimana pun, sistem yang digunakan nantinya harus tervalidasi terlebih dahulu di mana pembacaan nilai kromatogram dengan injeksi berulang mampu mencapai syarat umum yaitu

standar deviasi relatif (RSD) $\leq 2.0\%$ (USP; FDA). Berdasarkan hasil yang diperoleh, pemakaian kolom C18 dan fase gerak MeOH 100% (100 : 0) dapat digunakan untuk analisis kandungan zeatin menggunakan UHPLC. Penggunaan kolom C18 dan fase gerak MeOH 100% menghasilkan kromatogram dengan absorbansi dan bentuk yang baik (Gambar 1) dan nilai RSD yang memenuhi kriteria yang disarankan serta nilai keseluruhan RSD terbaik yaitu 1,87% (Tabel 1). Nilai RSD yang kecil (≤ 2) menunjukkan bahwa pemakaian kolom C18 dan fase gerak MeOH 100% menghasilkan data kromatogram yang akurat dan presisi. Sebelum digunakan untuk melakukan analisis kandungan zeatin pada jaringan kelapa sawit, kondisi terpilih yang telah ditentukan perlu dilakukan validasi lebih lanjut.

Validasi kondisi terpilih untuk analisis kandungan zeatin dengan UHPLC dapat dilakukan dengan analisis regresi kurva konsentrasi standar zeatin versus luas area kromatogram hasil pengukuran konsentrasi standar zeatin, serta penentuan presisi dan akurasi pengukuran konsentrasi zeatin standar. Hasil analisis regresi akan menghasilkan model persamaan, nilai koefisien korelasi (r) dan koefisien determinasi (r^2) (Moosavi dan Ghassabian 2018). Selanjutnya, *U.S. Federal Drug Administration (FDA)* merekomendasikan untuk menganalisis ragam terhadap data injeksi dan Van Loco *et al.* (2002) menyarankan tes *lack-of-fit (LoF)* maupun tes Mantel's fitting untuk memvalidasi model regresi yang dihasilkan.



Gambar 1. Kromatogram hasil analisis UHPLC untuk standar zeatin dengan kolom C18 dan menggunakan (a) fase gerak MeOH : air (90 : 10) atau (b) fase gerak MeOH : air (100 : 0) serta (c) dengan kolom Patisil SCX dengan fase gerak MeOH air (100 : 0)

Figure 1. Chromatogram of UHPLC analysis results of zeatin standard using C18 column and (a) mobile phase MeOH : water (90 : 10), (b) MeOH : water (100 : 0) and (c) using Partisil SCX column with mobile phase MeOH : water (100 : 0)

Dari hasil analisis regresi diperoleh nilai $r^2 = 0,9996$ (Gambar 2). Selain itu, hasil analisis ragam dan tes LoF diperoleh bahwa model regresi yang digunakan memenuhi persyaratan linearitas (Tabel 2, Gambar 2). Dengan demikian, kondisi analisis UHPLC yang dapat digunakan untuk analisis kandungan zeatin adalah menggunakan kolom C18 dan fase gerak MeOH 100%.

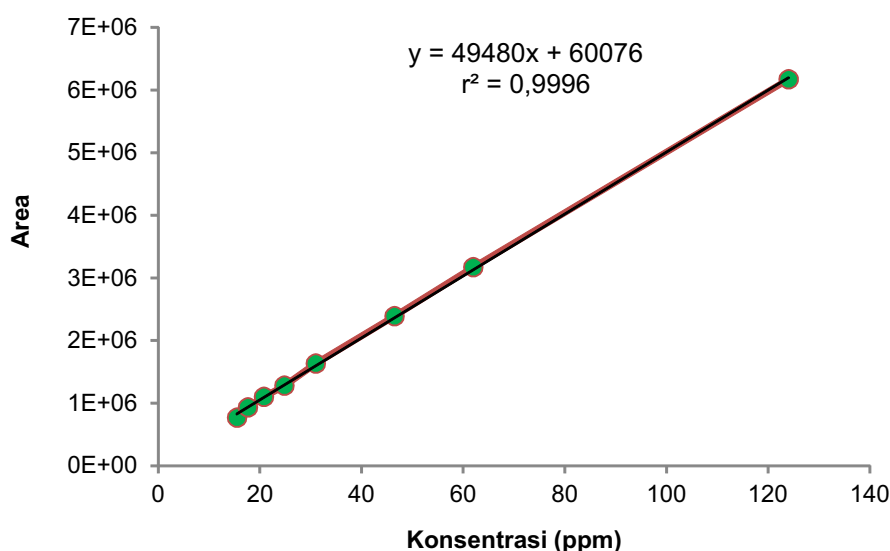
Akurasi diartikan sebagai ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis

sampel secara keseluruhan dengan kadar analit yang sebenarnya di dalam matriks sampel. Akurasi dinyatakan dengan persentase perolehan kembali (% *recovery*) (Betz *et al.*, 2011). Presisi dapat diartikan sebagai kedekatan antar data hasil dari beberapa kali pengukuran pada kondisi analisis yang sama (FDA 1994). Nilai presisi biasanya terdiri dari nilai keterulangan, keterulangan intermediet dan reproduksibilitas.

Tabel 2. Analisis ragam dan tes Lack-of-Fit (LoF) sebagai validasi model regresi yang dihasilkan pada pembentukan kurva linearitas

Table 2. ANOVA and Lack of Fit test as validation for regression model resulting from linearity curve construction

Sumber keragaman	Derajat Bebas	Jumlah Kuadrat	Kuadrat Tengah	Nilai F	Nilai P
Regresi	1	4,55E+13	4,55E+13	15408,14	0
Konsentrasi	1	4,55E+13	4,55E+13	15408,14	0
Galat	14	4,1381E+10	2,96E+09		
LoF	6	1,6287E+10	2,71E+09	0,87	0,558



Gambar 2. Kurva hubungan konsentrasi standar zeatin dengan luas area kromatogram yang dihasilkan pada penentuan linearitas

Figure 2. Curve constructed by zeatin standard concentration against chromatogram peak area as result in linearity determination

Penelitian ini hanya mengukur komponen keterulangan karena dilakukan di satu laboratorium saja. Nilai keterulangan yang diukur adalah nilai keterulangan instrumen dan keterulangan metode. USP merekomendasikan nilai $RSD \leq 2$ dengan injeksi minimal 5 – 6 kali dan FDA merekomendasikan nilai $RSD \leq 1$ dengan injeksi minimal 5 kali ($n \geq 5$). Nilai RSD yang lebih besar dapat diterima pada pengukuran impuritis level rendah pada analisis bahan aktif atau produk obat-obatan.

Hasil analisis menunjukkan bahwa persentase perolehan kembali sampel segar yang diekstraksi yaitu sebesar 107,30% - 117,67% dengan nilai RSD 3,47%

(Tabel 3) sehingga memenuhi standar validasi untuk akurasi pada analisis sampel segar. Hasil pengukuran nilai keterulangan (Tabel 4) menunjukkan nilai RSD masing-masing keterulangan baik instrumen maupun metode sebesar 0,56 dan 1,03 sehingga memperkuat kesimpulan sebelumnya bahwa kondisi analisis UHPLC yang dapat digunakan untuk analisis kandungan zeatin adalah menggunakan kolom C18 dan fase gerak MeOH 100%.

Batas deteksi merupakan batas di mana instrumen dapat mendeteksi keberadaan analit dalam sampel tanpa mempertimbangkan presisi nilai respon yang diperoleh dan dapat dibedakan dengan noise yang

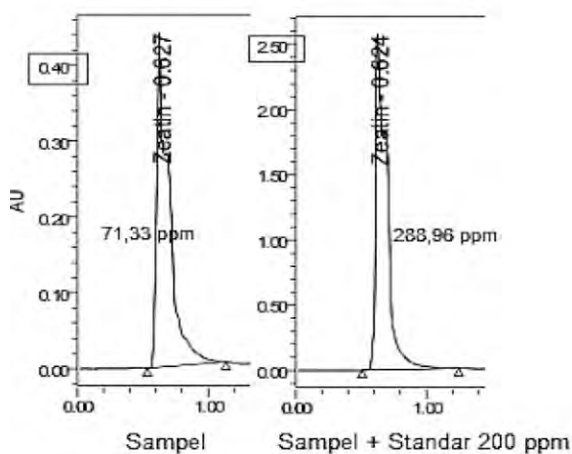
muncul. Batas kuantifikasi adalah batas nilai respon yang dihasilkan instrumen yang masih dapat mengikuti kaidah linearitas dan presisi ketika divalidasi (Armburster dan Pry 2008). Beberapa metode

penentuan *LoD* dan *LoQ* antara lain berupa evaluasi visual, pengukuran rasio sinyal/noise (*S/N*) serta perhitungan berdasarkan simpangan baku residual ($S_{y/x}$) dan slope pada model regresi linear (ICH 1996).

Tabel 3. Persentase perolehan kembali (akurasi) pada pengukuran konsentrasi zeatin pada sampel segar dengan penambahan standar 200 ppm

Table 3. Recovery percentage (accuracy) of zeatin analysis in fresh sample extraction with standard addition 200 ppm

n	Konsentrasi zeatin sampel (ppm)	Konsentrasi zeatin sampel + standar 200 (ppm)	Persentase Perolehan Kembali
1	56,52	291,87	117,67
2	57,97	293,40	117,72
3	71,33	288,96	108,81
4	75,50	309,04	116,77
5	76,48	297,41	110,46
6	76,32	299,94	111,81
7	76,38	303,76	113,69
8	72,14	286,73	107,30
9	72,11	293,04	110,46
Rata-rata			112,74
SD			3,91
RSD			3,47



Gambar 3. Profil kromatogram yang dihasilkan dari analisis zeatin pada sampel eksplan murni (respon detektor UV = 0,60 AU) dan sampel yang telah ditambahkan standar zeatin 200 ppm (respon detektor UV = 2,60 AU)

Figure 3. Chromatogram profile of zeatin analysis obtained from blank sample (UV detector response = 0,60 AU) and sample spiked with 200 ppm of zeatin standard (UV detector response = 2,60 AU)

Kromatogram yang dihasilkan pada analisis zeatin berupa puncak tunggal sehingga aplikasi model regresi linear dalam penentuan *LoD* dan *LoQ* relevan untuk digunakan (Shrivastava dan Gupta 2011). Diperoleh nilai *LoD* sebesar 2,457 ppm dan *LoQ* = 7,446 ppm (Tabel 4). Adapun nilai terkecil konsentrasi zeatin yang diperoleh pada sampel yang dianalisis yaitu sebesar 13,183 ppm.

Analisis kandungan zeatin pada daun muda eksplan kelapa sawit

Studi terdahulu menyebutkan sitokinin umumnya hanya disintesis di akar. Namun, beberapa hasil penelitian terkini menjabarkan bahwa biosintesis sitokinin terjadi di hampir seluruh bagian tumbuhan yang ditandai dengan adanya ekspresi gen IPT (Feng *et al.*, 2017). Percobaan Takei *et al.* (2001) pada pemberian nitrat secara eksogen pada tanaman jagung yang telah dihilangkan nitrogennya

menunjukkan bahwa akar menjadi jaringan yang pertama mensintesis sitokinin karena kehadiran nitrat. Akar juga memiliki kelimpahan sitokinin terbanyak yang kemudian didistribusikan dari akar ke xilem lalu ke daun. Sitokinin bertindak sebagai sinyal jarak jauh ketersediaan nitrogen dari akar hingga tunas dan mengatur arah perkembangan keduanya (Haberer dan Kieber 2002).

Analisis zeatin menunjukkan bahwa konsentrasi tertinggi diperoleh dari eksplan bagian ujung pada seluruh genotipe/varietas kecuali Avros. Konsentrasi zeatin tertinggi pada varietas Avros berasal dari eksplan bagian tengah, namun tidak berbeda nyata dengan konsentrasi zeatin eksplan bagian ujungnya (Gambar 5). Sitokinin dalam bentuk *trans*-zeatin riboside (tZR) disintesis di akar dan ditranslokasikan menuju daun melalui xilem. Akibat akumulasi gen respon sitokinin di daun (Takei *et al.*, 2001) tZR membentuk *trans*-zeatin (tZ) untuk digunakan di daun. Adapun sitokinin dalam bentuk isopentil (iP) disintesis

Tabel 4. Nilai keterulangan pada pengukuran area pembacaan kromatogram standar (instrumen) dan set berbagai sampel (metode)

Table 4. Repeatability value obtained from chromatogram peak area of standard (as instrument precision) and set of sample (as method precision)

n	Instrumen	Metode
	Area (standar)	RSD (per set sampel)
1	2341199	2,66
2	2321087	0,81
3	2313921	0,49
4	2320899	1,52
5	2299734	0,66
6	2320821	0,17
7	2335636	0,87
8	2330744	1,03
Rata-rata	2323005	
SD	13024	1,03*
RSD	0,56	

Keterangan : *Rerata RSD seluruh set sampel

Note : *Mean of RSD whole sample set

Tabel 5. Penentuan nilai LoD dan LoQ berdasarkan model linear yang dihasilkan oleh kurva kalibrasi
 Table 5. Determination of LoD and LoQ value based on linearity model obtained from curve calibration

n	Konsentrasi (ppm)	Area
1	15,50	764670
2	17,67	928690
3	20,77	1097293
4	24,80	1276461
5	31,00	1629279
6	46,50	2383742
7	62,00	3166424
8	124,00	6168026
	$S_{y/x}$	36841,327
	Slope	49479,827
	Intercept	60075,879
	r^2	0,9996
	LoD	2,457 ppm
	LoQ	7,446 ppm

di daun dan ditranslokasikan melalui floem (Kudo *et al.*, 2010). Konsentrasi zeatin yang tinggi di ujung gelendong daun sumber eksplan mungkin berkaitan dengan ekspresi gen respon sitokinin yang tinggi akibat tingginya aktivitas pembelahan dan perkembangan sel pada lokasi tersebut. Di samping itu, perlu diingat bahwa sitokinin disintesis pada hampir seluruh bagian tumbuhan, termasuk daun, sehingga tingginya konsentrasi juga mungkin disebabkan akumulasi produk hasil sintesis.

KESIMPULAN

Metode yang dikembangkan untuk analisis zeatin yang terkandung pada eksplan daun kelapa sawit menggunakan UHPLC dengan ekstraksi dan purifikasi sampel secara LLE mampu mengkuantifikasi zeatin dengan baik dan memenuhi uji kesesuaian sistem dan validasi metode. Metode yang cukup praktis ini berpotensi untuk digunakan sebagai metode kuantifikasi zeatin pada seluruh jaringan tumbuhan dan mampu diaplikasikan pada kajian-kajian penelitian

yang melibatkan analisis fitohormon pada tumbuhan dan fenomena fisiologisnya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis berterima kasih kepada seluruh jajaran manajemen Pusat Penelitian Kelapa Sawit (PPKS) yang telah memberikan fasilitas, bantuan tenaga kerja dan akses laboratorium selama penelitian ini dilaksanakan. Ucapan terima kasih khusus diberikan kepada Ibu Alida Lubis yang telah membantu dalam analisis zeatin dan workshop penggunaan alat UHPLC. Penulis juga menyampaikan terima kasih kepada Lembaga Pengelola Dana Pendidikan (LPDP) yang telah mendanai sebagian penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

Armbruster, D.A. dan T. Pry. 2008. Limit of Blank, Limit of Detection and Limit of Quantitation. *Clin Biochem Rev* 29 (Suppl 1) : S49 – S52.

- Bai, Y., F. Du, Y. Bai dan H. Liu. 2010. Determination strategies of phytohormones: recent advances. *Analytical Methods* 2 (12) : 1867 - 1873. <https://doi.org/10.1039/c0ay00471e>.
- Barkawi, L.S., Y.Y. Tam, J.A. Tillman, J. Normanly dan J.D. Cohen. 2010. A high-throughput method for the quantitative analysis of auxins. *nature protocols* 5 (10) : 1609 - 1618. doi:10.1038/nprot.2010.118.
- Betz, J.M., P.N. Brown dan M.C. Roman. 2011. Accuracy, Precision, and Reliability of Chemical Measurements in Natural Products Research. *Fitoterapia* 82(1): 44-52. doi: 10.1016/j.fitote.2010.09.011.
- Chen, Y., L. Yang, W. Zhang, Z. Deng, F. Wang, Y. Li, L. Meng, N. Wu, F. Ban, dan S. Zhang. 2017. Simultaneous Analysis of Two Phytohormones in Chili and Wheat Using HPLC Using Novel Calixarene as SPE Sorbent. *Journal of Chromatographic Science* 55 (3) : 358-365. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmw173>.
- Cosic, T., V. Motyka, M. Raspor, J. Savic, A. Cingel, B. Vinterhalter, D. Vinterhalter, A. Travnickova, P.I. Dobrev, B. Bohanec dan S. Ninkovic. 2015. In vitro shoot organogenesis and comparative analysis of endogenous phytohormones in kohlrabi (*Brassica oleracea* var. *gongyloides*): effects of genotype, explant type and applied cytokinins. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 121(3):741-760. DOI 10.1007/s11240-015-0742-2.
- Davies, P.J. 1995. *Plant Hormones : Physiology, biochemistry and molecular biology*. 2nd ed (Editor : Peter J. Davies). Kluwer Academic, Netherland.
- [FDA/CDER] US Food and Drug Administration/Center for Drug Evaluation and Research. 1994. *Reviewer Guidance-Validation of Chromatographic Methods*, CMC 3. Maryland, United States.
- Fu, J.H., X.H. Sun, J.D. Wang, J.F. Chu dan C.Y. Yan. 2011. Progress in quantitative analysis of plant hormones. *Chinese Science Bulletin* 56 (4): 355-366. doi: 10.1007/s11434-010-4243-8
- Gajdošová, S., L. Spíchal, M. Kamínek, K. Hoyerová, O. Novák, P.I. Dobrev, P. Galuszka, P. Klíma, A. Gaudinová, E. Žižková, J. Hanuš, M. Dančák, B. Trávníček, B. Pešek, M. Krupička, R. Vaňková, M. Strnad dan V. Motyka. 2011. Distribution, biological activities, metabolism, and the conceivable function of cis-zeatin-type cytokinins in plants. *Journal of Experimental Botany* 62 (8) : 2827 - 2840. doi:10.1093/jxb/erq457.
- Gerd Ulrich Balcke, G.U., V. Handrick, N. Bergau, M. Fichtner, A. Henning, H. Stellmach, A. Tissier, B. Hause dan A. Frolov. 2012. An UPLC-MS/MS method for highly sensitive high-throughput analysis of phytohormones in plant tissues. *Plant Methods* 8 (47) : 1 - 11. doi: 10.1186/1746-4811-8-47.
- Großkinskya, D.K., A. Albacetea, A. Jammera, P. Krbeza, E.v.d. Graaffa, H. Pfeifhofer dan T. Roitscha. 2014. A Rapid Phytohormone and Phytoalexin Screening Method for Physiological Phenotyping (Letter to Editor). *Molecular Plant* 7 (6) : 1053-1056. Harahap, I.Y., T.C. Hidayat dan R.D. Setiowati. 2010 Oil Palm Clone Production in IOPRI Laboratory. In : Kien W.C. (ed). *International Seminar on Advances in Oil Palm Tissue Culture*. Yogyakarta, Indonesia. International Society for Oil Palm Breeders. 53 - 58.
- Heyl, A., M. Riefler, G.A. Romanov dan T. Schmölling. 2012. Properties, functions and evolution of cytokinin receptors. *European Journal of Cell Biology* 91(4) : 246 - 256. doi: 10.1016/j.ejcb.2011.02.009
- Hou, S., J. Zhu, M. Ding dan G. Lv. 2008. Simultaneous determination of gibberellic acid, indole-3-acetic acid and abscisic acid in wheat extracts by solid-phase extraction and liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Talanta* 76 : 798-802.
- Hoyerová, K., A. Gaudinová, J. Malbeck dan P.I. Dobrev. 2006. Efficiency of different methods of extraction and purification of cytokinins. *Phytochemistry* 67(11):1151-1159. DOI: 10.1016/j.phytochem.2006.03.010.
- [ICH] International Conference on Harmonization. 1996. *Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Validation of analytical procedures: Text*

- and Methodology. ICH-Q2B, Geneva, Switzerland.
- Jain, S.M. dan M. Nakhooda. 2017. Clonal and micropropagation. In : Encyclopedia of Applied Plant Sciences 2nd Ed 22 : 428–432. Elsevier Ltd, Netherland. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123948076001441>.
- Jayanthi, M., B. Susanthi, N.M. Mohan dan P.K. Mandal. 2015. In vitro somatic embryogenesis and plantlet regeneration from immature male inflorescence of adult Dura and Tenera palms of *Elaeis guineensis* (Jacq.). SpringerPlus 4 (1) : 256 – 263. DOI 10.1186/s40064-015-1025-4
- Kushairi, A., A.T. Hashim, Z. Ishak, M. Ong-Abdullah, S.K. Rosli, S.E. Ooi dan N. Rajanaidu. 2010. Production, Performance and Advances in Oil Palm Tissue Culture. In : Kien W.C. (ed). International Seminar on Advances in Oil Palm Tissue Culture. Yogyakarta, Indonesia. International Society for Oil Palm Breeders. 45 – 52.
- Li, Y., C. Zhou, J. Zhang dan J. Xu. 2016. Simultaneous analysis of ten phytohormones in *Sargassum horneri* by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry. Journal of Separation Science 39 (10) : 1 – 10. DOI: 10.1002/jssc.201501239
- Loh, S.K. 2016. The potential of the Malaysian oil palm biomass as a renewable energy source. Energy Conversion and Management 141: 285 – 298. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enconman.2016.08.081>
- Macdonald, G.K., K.A. Brauman, S. Sun, K.M. Carlson, E.S. Cassidy, J.S. Gerber dan P.C. West. 2015. Rethinking agricultural trade relationships in an era of globalization. BioScience 65 (3) : 1 – 15. Doi:10.1093/Biosci/Biu225.
- Moosavi, S.M. dan S. Ghassabian. 2018. Calibration and Validation of Analytical Methods - A Sampling of Current Approaches : Chapter 6 (Editor : Mark Stauffer). IntechOpen, United Kingdom.
- Moubayidin, L., R. Di Mambro dan S. Sabatini. 2009. Cytokinin-auxin crosstalk. Trends in Plant Science. 14 (10) : 557–562. doi: 10.1016/j.tplants.2009.06.010.
- Muller, M. dan S. Munne-Bosch. 2011. Rapid and sensitive hormonal profiling of complex plant sample by liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. Plant Methods 7 (1) : 1 - 11. doi : 10.1186/1746-4811-7-37.
- Nakurte, I., A. Keisa dan N. Rostoks. 2012. Development and Validation of a Reversed-Phase Liquid Chromatography Method for the Simultaneous Determination of Indole-3-Acetic Acid, Indole-3-Pyruvic Acid, and Abscisic Acid in Barley (*Hordeum vulgare* L.). Journal of Analytical Methods in Chemistry 2012 (103575) : 1 – 6. doi: 10.1155/2012/103575.
- Niu, Q., Y. Zong, M. Qian, F. Yang dan Y. Teng. 2014. Simultaneous quantitative determination of major plant hormones in pear flowers and fruit by UPLC/ESI-MS/MS. Analytical Methods 6 : 1766-1773. DOI:10.1039/C3AY41885E.
- Nugroho, Y.A., I.M. Sumertajaya, N.M.A. Wiendi, N. Toruan-Mathius. 2014. Estimation of genetic parameter for in vitro culture traits and selection best progenies for Tenera oil palm tissue culture. Energy Procedia. 47 : 316 - 322.
- Ooi, S.E., O. Novák, K. Doležal, Z. Ishak dan M. Ong-Abdullah. 2013. Cytokinin differences in in vitro cultures and inflorescences from normal and mantled oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). Journal of Plant Growth Regulation 32 (4): 865–874. <https://doi.org/10.1007/s00344-013-9352-6>.
- Porfirio, S., M.D.R.G. da Silva, A. Peixe, M.J. Cabrita dan P. Azadi. 2016. Current analytical methods for plant auxin quantification – A review. Analytica Chimica Acta 902 : 8 - 21. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2015.10.035>.
- [Pusdatin] Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian. 2017. Outlook Kelapa Sawit. Jakarta (ID). Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian.
- Roef, L. dan H.V. Onckelen. 2010. Plant Hormones - Biosynthesis, Signal Transduction, Action! 3rd edition (ed : Peter J Davies) : 241 – 261. Springer, Dordrecht. DOI : 10.1007/978-1-

- 4020-2686-7_12.
- Schaller, G.E., A. Bishopp dan J.J. Kieber. 2015. The Yin-Yang of Hormones: Cytokinin and auxin interactions in plant development. *The Plant Cell Online* 27 (1): 44 – 63. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.133595>.
- Shrivastava, A. dan V.B. Gupta. 2011. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chronicles of Young Scientist* 2 (1) : 21 – 25. DOI: 10.4103/2229-5186.79345.
- Snyder, L.R., J.J. Kirkland dan J.W. Dolan. 2010. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, 3rd ed. John Wiley & Sons, Inc., United States. DOI:10.1002/9780470508183
- Svacinová, J., O. Novák , L. Placková, R. Lenobel, J. Holík, M. Strnad dan K. Doležal. 2012. A new approach for cytokinin isolation from *Arabidopsis* tissues using miniaturized purification : pipette tip solid-phase extraction. *Plant Methods* 8 (17) : 1 – 14. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-8-17>.
- Trapp, M.A., G.D. De Souza, E. Rodrigues-Filho, W. Boland dan A. Mithöfer. 2014. Validated method for phytohormone quantification in plants. *Frontiers in Plant Science* 5 (417) : 1 – 11. doi: 10.3389/fpls.2014.00417
- [USP-NF 40/35] United State Pharmacopeia 40 – National Formulary 35. 2016. First Supplement : Chromatography <621> 508, 8071. United States Pharmacopeial Convention. Maryland, United States.
- Van Looc, J., M. Elskens, C. Croux dan H. Beernaert. 2002. Linearity of calibration curve : use and misuse of the correlation coefficient. *Accreditation and Quality Assurance* 7: 281–285. DOI 10.1007/s00769-002-0487-6.
- World Growth. 2011. Laporan World Growth 2011 (in Bahasa). Manfaat minyak sawit bagi perekonomian Indonesia. Melbourne, Australia.
- Yalçın, S., E.S. Okudan, O. Karakas, A.N. Önem dan K.S. Baskan. 2019. Identification and quantification of some phytohormones in seaweeds using UPLC-MS/MS. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 42 (15 – 16) : 475-484. <https://doi.org/10.1080/10826076.2019.1625374>.
- Zhang, W., R. Swarup, M. Bennett, G.E. Schaller dan J.J. Kieber. 2013. Cytokinin Induces Cell Division in the Quiescent Center of the *Arabidopsis* Root Apical Meristem. *Current Biology* 23 (20): 1979–1989. doi: 10.1016/j.cub.2013.08.008.

