

Pengaruh Konsentrasi Sukrosa terhadap Produksi Flavonoid pada Kultur Kalus Ginseng Jawa (*Talinum paniculatum* (Jacq.) Gaertn.)

Josiah Herald Matheos, Ratih Restiani*, Dwi Adityarini

Universitas Kristen Duta Wacana, Jl. Dr. Wahidin Sudirohusodo No. 5-25

Yogyakarta, Indonesia. 55224

*email: ratih.restiani@staff.ukdw.ac.id

Dikirim: 2022-08-14 Direvisi: 2022-10-27 Diterima: 2022-12-22

Abstrak

Ginseng Jawa (*Talinum paniculatum* (Jacq.) Gaertn.) merupakan tanaman obat dengan berbagai manfaat karena memiliki metabolit sekunder yang beragam seperti saponin, tanin, triterpenoid, hingga flavonoid. Flavonoid merupakan salah satu metabolit sekunder yang dominan dihasilkan oleh daun Ginseng Jawa. Flavonoid dapat ditingkatkan produksinya melalui kultur *in vitro* dengan penambahan sukrosa pada konsentrasi optimal. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penambahan sukrosa pada berbagai konsentrasi terhadap peningkatan biomassa dan produksi flavonoid kalus. Desain yang digunakan dalam penelitian adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan faktor tunggal yaitu konsentrasi sukrosa (0 ; 10 ; 20 ; 30 dan 40 g/L) sebanyak 5 ulangan. Kalus diinisiasi dari eksplan daun yang dikulturkan dalam media MS dengan penambahan 3 mg/L Kinetin + 2 mg/L 2,4-D + variasi konsentrasi sukrosa. Kalus dipanen pada hari ke-28, dikeringkan menggunakan oven pada suhu 40⁰ C sampai diperoleh berat kering konstan kemudian diekstraksi menggunakan metanol 96% dengan metode maserasi. Hasil menunjukkan bahwa konsentrasi sukrosa 30 g/L dapat meningkatkan biomassa kalus secara optimal (0,081 g) dan konsentrasi sukrosa 40 g/L meningkatkan kandungan flavonoid total (TFC) sebesar 19,04 mg QE/g berat kering kalus. Hasil penelitian ini berperan penting sebagai informasi dasar mengenai kondisi optimal untuk peningkatan biomassa dan produksi flavonoid melalui kultur kalus *T.paniculatum*.

Kata kunci: Biomassa, Callus, Flavonoid, Sukrosa, *Talinum paniculatum*

Effect of Sucrose Concentration on Flavonoid Production in Callus Culture of Javanese Ginseng (*Talinum paniculatum* (Jacq.) Gaertn.)

Abstract

Javanese ginseng (*Talinum paniculatum* (Jacq.) Gaertn.) is a medicinal plant with various benefits because it has secondary metabolites such as saponins, tannins, triterpenoids, to flavonoids. Flavonoids are the prominent secondary metabolites produced by Javanese Ginseng leaves. Flavonoid production could be enhanced through *in vitro* culture with the addition of sucrose at optimal concentrations. This study aimed to determine the effect of adding sucrose at various concentrations on the increase in callus biomass and flavonoid production. The research design used in this study was a completely randomized design (CRD) with a single factor of sucrose concentration (0; 10; 20; 30 and 40 g/L) with 5 replications. Callus was initiated from leaf explants cultured in MS medium with the addition of 3 mg/L Kinetin + 2 mg/L 2,4-D + varying concentrations of sucrose. Callus was harvested on the 28th day, dried in an oven at 40⁰ C until a constant dry weight was obtained, and then extracted using 96% methanol by maceration method. The results showed that a sucrose concentration of 30 g/L could increase callus biomass optimally (0.081 g) and a sucrose concentration of 40 g/L increased the total flavonoid content (TFC) of 19.04 mg QE/g dry weight of callus. The results of this study have a significant role as basic information regarding the optimal conditions for increasing biomass and flavonoid production through callus culture of *T. paniculatum*.

Keywords: Biomass, Callus, Flavonoid, Sucrose, *Talinum paniculatum*

*Korespondensi: Ratih Restiani, Email: ratih.restiani@staff.ukdw.ac.id

1. PENDAHULUAN

Ginseng Jawa (*Talinum paniculatum*) merupakan jenis tanaman obat yang umumnya digunakan oleh masyarakat Indonesia dalam menyembuhkan penyakit seperti diare, menurunkan kadar kolesterol, mencegah penyakit kanker dan dapat meningkatkan daya tahan tubuh (Erin *et al.*, 2020; Praptiningsih & Soertojo, 2014). Tanaman ini mengandung metabolit sekunder seperti saponin, tanin, triterpenoid, flavonoid, dan polifenol (Wardani *et al.*, 2004). Flavonoid merupakan salah satu jenis polifenol dengan 15 atom karbon dan sering dijumpai pada tanaman yang berfungsi sebagai antiinflamasi, antibiotik, antikanker, dan antidiabetes (Arifin & Ibrahim, 2018). Secara alami, sintesis metabolit sekunder oleh tanaman dapat berlangsung saat tanaman mengalami cekaman yang disebabkan predator atau senyawa asing dan kondisi tersebut dapat merugikan tanaman. Melalui pendekatan Bioteknologi, metabolit sekunder saat ini dapat ditingkatkan akumulasinya melalui pemberian cekaman yang bersifat biotik atau abiotik ke dalam sistem kultur *in vitro* sehingga hal tersebut dapat mengubah jalur sintesis metabolit sekunder sesuai dengan yang ditargetkan (Chandran *et al.*, 2020)

Kultur *in vitro* merupakan salah satu metode perbanyak tanaman yang dapat diatur pertumbuhan dan perkembangannya secara aseptik dalam media kultur (Yuniardi, 2019). Selain itu, kultur *in vitro* dapat menyediakan kebutuhan metabolit sekunder di bidang farmasi (Radha *et al.*, 2011). Peningkatan metabolit sekunder melalui metode kultur *in vitro* dapat dilakukan dengan memodifikasi komposisi penyusun media meliputi sukrosa, garam fosfat, nitrogen dan Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) (Karjadi & Buchory, 2008) serta faktor lingkungan seperti temperatur, pH media dan kualitas cahaya (Pangestika *et al.*, 2015). Penerapan teknik kultur *in vitro* dalam meningkatkan produksi metabolit sekunder umumnya memiliki kendala yaitu setiap jenis tanaman dan jenis kultur membutuhkan komposisi media yang optimal untuk dapat memproduksi metabolit sekunder yang ditargetkan. Salah satu upaya yang dapat dilakukan adalah dengan mengoptimalkan penambahan sukrosa pada konsentrasi yang optimal sebagai salah satu komponen penyusun media kultur *in vitro* yang penting untuk meningkatkan biomassa dan kandungan senyawa metabolit sekunder.

Sukrosa merupakan salah satu komponen media pada kultur *in vitro* yang berperan sebagai

penyedia karbon bagi pertumbuhan dan perkembangan kalus dan sebagai pemicu dalam meningkatkan produksi metabolit sekunder (Julianti *et al.*, 2021). Berbagai penelitian mengenai pengaruh pemberian sukrosa pada berbagai konsentrasi terhadap produksi senyawa metabolit sekunder melalui kultur *in vitro* telah dilakukan. Sari *et al.* (2017) menunjukkan pada konsentrasi sukrosa sebesar 30 g/L dapat meningkatkan kandungan flavonoid, fenol, alkaloid, saponin dan steroid pada kultur kalus *Myrmecodia tuberosa*. Selain itu, Julianti *et al.* (2021) melaporkan hasil penelitiannya yaitu konsentrasi sukrosa 40 g/L merupakan konsentrasi optimal dalam meningkatkan kandungan flavonoid total sebesar 1,19 mg/g pada kultur kalus *Solanum lycopersicum*. Sejauh ini, penelitian mengenai pengaruh konsentrasi sukrosa terhadap produksi flavonoid pada kultur kalus Ginseng Jawa (*T. paniculatum*) belum pernah dilakukan. Oleh karena itu, penelitian ini penting untuk dilakukan untuk mengetahui pemberian sukrosa pada berbagai konsentrasi dalam meningkatkan kandungan flavonoid pada kalus Ginseng Jawa.

2. BAHAN DAN METODE

2.1 Prosedur

Penelitian dilakukan pada bulan Maret hingga Juli 2022 di Laboratorium Bioteknologi Dasar II, Program Studi Biologi, Fakultas Bioteknologi, Universitas Kristen Duta Wacana, Yogyakarta. Desain penelitian yang digunakan yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL) untuk mengetahui pengaruh penambahan sukrosa pada berbagai konsentrasi terhadap biomassa dan *Total Flavonoid Content* (TFC) kalus (Tabel 1). Setiap perlakuan diulangi sebanyak 5 kali.

Bahan tanaman yang digunakan adalah tanaman Ginseng Jawa (*Talinum paniculatum*) yang telah dipelihara di Laboratorium Fakultas Bioteknologi Dasar, Universitas Kristen Duta Wacana. Tanaman yang dipilih sebagai sumber eksplan adalah tanaman Ginseng Jawa yang sehat, memiliki daun berwarna hijau segar, tidak layu, dan tidak ditemukan hama. Sebelum digunakan dalam penelitian, terlebih dahulu dilakukan identifikasi tanaman di Laboratorium Taksonomi Tumbuhan, Fakultas Biologi UGM. Identifikasi ini bertujuan untuk memastikan tanaman yang digunakan adalah dari species *Talinum paniculatum* Jacq. (Gaertn.).

Tabel 1. Kombinasi variasi konsentrasi sukrosa dan jumlah ulangan

Konsentrasi Sukrosa (g/L)	Ulangan				
	U ₁	U ₂	U ₃	U ₄	U ₅
S ₀	S ₀ U ₁	S ₀ U ₂	S ₀ U ₃	S ₀ U ₄	S ₀ U ₅
S ₁₀	S ₁₀ U ₁	S ₁₀ U ₂	S ₁₀ U ₃	S ₁₀ U ₄	S ₁₀ U ₅
S ₂₀	S ₂₀ U ₁	S ₂₀ U ₂	S ₂₀ U ₃	S ₂₀ U ₄	S ₂₀ U ₅
S ₃₀	S ₃₀ U ₁	S ₃₀ U ₂	S ₃₀ U ₃	S ₃₀ U ₄	S ₃₀ U ₅
S ₄₀	S ₄₀ U ₁	S ₄₀ U ₂	S ₄₀ U ₃	S ₄₀ U ₄	S ₄₀ U ₅

Keterangan: S = Sukrosa, U = Ulangan

Bahan utama yang digunakan dalam pembuatan media Murashige & Skoog (MS) yaitu stok makronutrien, stok mikronutrien, stok iron, stok vitamin, myo-inositol, ZPT 2,4 Diklorofenoksiasetat (2,4-D), Kinetin, sukrosa, larutan pH dan akuades. Bahan yang digunakan dalam sterilisasi eksplan yaitu tween 80, alkohol dan detergen cair. Selain itu bahan utama yang digunakan dalam ekstraksi kalus adalah methanol 96% dan standard quercetin untuk menghitung TFC.

Alat yang digunakan yaitu botol kultur, labu erlenmeyer, gelas kimia, tabung reaksi, cawan petri, pinset, autoclave, Laminar Air Flow (LAF), oven, stereo mikroskop, perkamen, aluminium foil dan plastik wrap.

2.2 Ekstraksi Kalus

Ekstraksi dan pengukuran TFC pada kalus menggunakan metode (Park *et al.*, 2020) yang telah mengalami modifikasi. Kalus dengan berat kering yang konstan kemudian diekstraksi menggunakan pelarut metanol. Metode ekstraksi yang digunakan yaitu maserasi dengan perbandingan bubuk simplisia dan pelarut yaitu 1 : 100 (b/v). Bubuk simplisia diambil 0,2 g lalu diekstraksi dengan metanol 96% kemudian dihomogenkan dan didiamkan selama 1 hari. Hasil maserasi disaring

menggunakan kertas saring kemudian dievaporasi menggunakan *waterbath* pada suhu 65 °C hingga volume akhir mencapai 0,2 mL. Kemudian dilakukan uji kolorimetri untuk pengukuran *Total Flavonoid Content* (TFC) Hasil diukur menggunakan spektrofotometer *UV-vis* dengan panjang gelombang 510 nm.

2.3 Data analisis

Semua data kecuali morfologi kalus dan persentase pertumbuhan kalus disajikan sebagai rerata ± standar deviasi (SD). Data tahap inisiasi kalus, persentase pertumbuhan kalus, intensitas kalus, dan morfologi kalus dianalisis secara deskriptif. Deskripsi intensitas kalus dilakukan berdasarkan standar skoring yang telah diuraikan pada Tabel 2. Selain itu, data waktu inisiasi kalus, biomassa kalus dan *Total Flavonoid Content* (TFC) dianalisis secara statistik dengan uji ANOVA taraf 5% menggunakan program IBM SPSS *Statistics* V21 x86. Jika nilai signifikansi kurang dari 5%, dapat dinyatakan bahwa hasil signifikan. Hasil yang signifikan akan dilakukan uji lanjutan menggunakan uji DMRT.

Tabel 2. Standar skoring intensitas kalus

Skoring	Keterangan
+	Kalus tumbuh di bagian tepi eksplan
++	Kalus tumbuh di bagian tepi dan mulai mengalami penebalan ke bagian tengah eksplan
+++	Kalus mengalami penebalan beberapa lapisan memenuhi permukaan eksplan
++++	Kalus tumbuhan menutupi keseluruhan permukaan eksplan

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

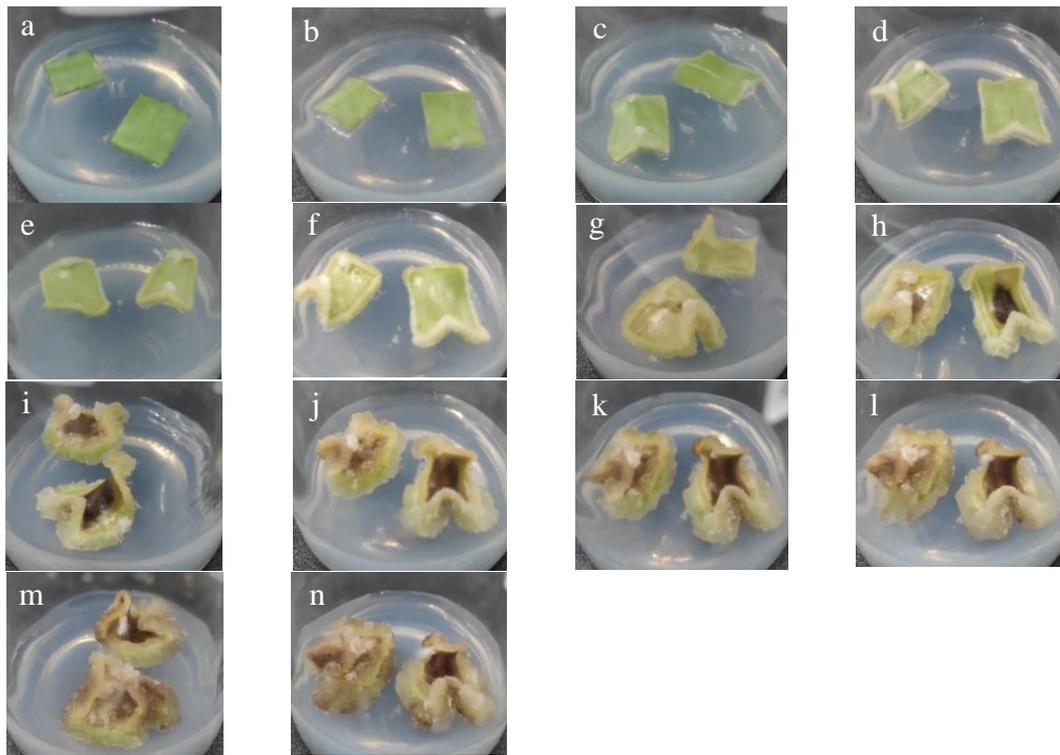
Tahapan Inisiasi Kalus *T. paniculatum*

Gambar 1 menunjukkan tahap inisiasi dan pertumbuhan kalus *T. paniculatum* sejak hari ke-0 hingga 28 hari setelah tanam (HST). Secara umum, inisiasi kalus dari eksplan dapat terjadi karena interaksi Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) (hormon yang ditambahkan secara eksogen) dan hormone yang secara alami ada dalam eksplan (hormon endogen). ZPT yang umum digunakan dalam menginisiasi kalus yaitu hormon auksin pada konsentrasi yang rendah sedangkan penggunaan hormon sitokinin berperan dalam pembentangan, pembesaran dan pembelahan sel (Sartika & Santosa, 2012). Kombinasi 2,4-D (auksin) dan kinetin (sitokinin) dapat menstimulus pembentukan kalus eksplan *T. paniculatum* secara optimal (Herman, 2019).

Gambar 1.a menunjukkan belum adanya perubahan pada eksplan pada 2 HST. Selanjutnya eksplan mulai menunjukkan perubahan yaitu membentuk lengkungan dan pembengkakan pada 4 HST. Pembengkakan ini dapat disebabkan masuknya air dan nutrisi dari media MS (Linardi *et al.*, 2022). Tahap inisiasi kalus mulai terjadi khususnya di bagian tulang daun pada 6 HST. Hal ini disebabkan adanya respon eskplan terhadap perlukaan yang terjadi saat pemotongan eksplan dan interaksi eksplan dengan jenis zat pengatur tumbuh (eksogen dan endogen) sehingga menstimulasi inisiasi dan pertumbuhan kalus. Gambar 1.d menunjukkan pembelahan dan pembesaran kalus terus berlangsung. Kalus semakin melengkung dan tekstur kalus semakin padat pada 12 HST (Gambar 1.f.). Eksplan yang berumur 2 minggu mulai mengalami penuaan pada warna kalus dan bagian tengah eksplan mulai mengalami perubahan warna menjadi kecoklatan. Perubahan warna kalus menjadi coklat umumnya dapat disebabkan karena sel-sel komponen penyusun kalus telah mengalami penuaan dan dapat terjadi karena adanya akumulasi senyawa

fenolik yang teroksidasi dan terakumulasi dalam kalus. Gambar 1.g menunjukkan tekstur dari kalus yang semula kompak menjadi remah yang ditunjukkan kalus terlihat lebih transparan. Seiring dengan pertumbuhan kalus, eksplan daun *T. paniculatum* mengalami nekrosis (Gambar 1.h – m). Pada hari ke-28, ukuran kalus semakin besar disertai perubahan morfologi kalus (Gambar 1.n). Pembesaran sel terjadi ketika dinding sel mulai membesar yang diakibatkan peningkatan daya plastisitas dinding sel serta mulai terbentuknya enzim selulase yang akan meluruhkan dinding sel sehingga oksigen, air dan garam mineral mudah melalui membran sel (Fauziyyah *et al.*, 2012).

Menurut Bakyyi (2005), beberapa faktor seperti kualitas tanaman, koleksi eksplan, ukuran eksplan hingga kondisi aseptis media dapat berpengaruh terhadap keberhasilan pertumbuhan kultur. Kondisi eksplan menentukan keberhasilan eksplan dalam merespon komposisi nutrien dan zat pengatur tumbuh yang terkandung di dalam media yang dapat dibuktikan oleh pembentukan kalus. Menurut Smith (2000), pertumbuhan kalus terdiri dari 5 fase antara lain fase lag, fase eksponensial, fase linier, fase penurunan kecepatan pertumbuhan sel dan fase stasioner. Pada fase stasioner, umumnya sel akan berfokus pada pertahanan sel yaitu memproduksi metabolit sekunder. Menurut Wijaya *et al.* (2020) pertumbuhan kalus *T. paniculatum* pada hari ke-0 hingga ke-28 termasuk ke fase lag atau fase awal pembentukan kalus dibuktikan dengan pertumbuhan kalus yang lambat. Selain zat pengatur tumbuh, komposisi sukrosa berperan dalam pembentukan, pertumbuhan dan perkembangan kalus. Sukrosa merupakan nutrien organik selain vitamin yang ada dalam media kultur. Dalam kultur *in vitro*, sukrosa berperan sebagai sumber karbon (Bhojwani & Dantu, 2012) dimana sukrosa akan didegradasi menjadi gula sederhana yaitu glukosa dan fruktosa. Glukosa akan berperan sebagai sumber energi dalam pembentukan sel kalus sedangkan fruktosa berperan dalam perkembangan sel yaitu antioksidan (Shofiyani & Purnawanto, 2017).



Gambar 1. Tahap inisiasi kalus dari eksplan daun *T. paniculatum* selama 28 hari pengamatan. Keterangan: a) 2HST, b) 4 HST, c) 6 HST, d) 8 HST, e) 10 HST, f) 12 HST, g) 14 HST, h)16 HST, i)18 HST, j) 20 HST, k) 22 HST, l) 24 HST, m) 26 HST, n) 28 HST (*HST : Hari Setelah Tanam)

Pengaruh Sukrosa terhadap Intensitas, Waktu Inisiasi, Persentase Pertumbuhan dan Morfologi Kalus *T. paniculatum*

Eksplan daun *T. paniculatum* dapat membentuk kalus jika kebutuhan energi terpenuhi. Energi tersebut akan digunakan sel dalam menutupi luka pada eksplan dengan cara pembentukan kalus. Sukrosa sebagai sumber energi dalam media pertumbuhan eksplan berpengaruh terhadap inisiasi dan pertumbuhan kalus. Variasi konsentrasi sukrosa mempengaruhi persentase pertumbuhan kalus. Hal ini dibuktikan melalui hasil pada Tabel 3 yang menunjukkan bahwa penambahan sukrosa pada berbagai konsentrasi (10-40 mg/L) berhasil menumbuhkan kalus pada semua eksplan yang ditanam (100%) kecuali pada kontrol yang tidak menunjukkan adanya pertumbuhan eksplan. Hasil ini sejalan dengan Sitorus *et al.* (2011), yang menunjukkan bahwa konsentrasi sukrosa 0 g/L tidak mampu menginisiasi pembentukan kalus hingga hari ke 30 setelah tanam. Hal ini mengindikasikan bahwa kebutuhan energi dalam media kultur melalui penambahan sukrosa sudah memberikan cukup energi bagi eksplan untuk menginisiasi pertumbuhan kalus. Namun, respon pertumbuhan kalus secara spesifik pada berbagai konsentrasi

sukrosa menunjukkan hasil yang berbeda. Hal ini ditunjukkan melalui intensitas kalus pada Tabel 3. Pada kontrol, eksplan tidak dapat membentuk kalus dan mengalami nekrosis karena ketiadaan sukrosa sebagai sumber karbon. Intensitas kalus tertinggi (++++) ditunjukkan pada media dengan penambahan konsentrasi sukrosa 30 g/L, sedangkan pada konsentrasi yang lebih tinggi yaitu (40 g/L) dan lebih rendah yaitu (10 dan 20) g/L menunjukkan intensitas kalus yang lebih rendah (+++). Hasil ini mengindikasikan bahwa konsentrasi sukrosa yang optimal dapat meningkatkan intensitas pertumbuhan kalus. Pada kultur kalus *T.paniculatum*, penambahan sukrosa sebanyak 30 g/L merupakan konsentrasi yang optimal dalam meningkatkan intensitas pertumbuhan kalus. Penambahan sukrosa pada konsentrasi yang lebih rendah cenderung belum cukup meningkatkan pertumbuhan kalus (Sitorus *et al.*, 2011), sebaliknya penambahan sukrosa pada konsentrasi yang lebih tinggi cenderung dapat mengganggu tekanan osmotik pada media kultur sehingga dapat berdampak pada penyerapan nutrisi oleh kalus. Gangguan ini dapat menghambat pertumbuhan sel hingga dapat mengakibatkan kematian sel akibat terjadi pecahnya dinding sel (Inayah, 2015).

Tabel 3. Pengaruh konsentarsi sukrosa terhadap intensitas, waktu inisiasi, persentase pertumbuhan dan morfologi kalus *T. paniculatum* pada 28 HST

Perlakuan (g/L)	Dokumentasi	Intensitas	Waktu Inisiasi (Hari)	Persentase Pertumbuhan (%)	Morfologi	
					Warna	Tekstur
0		-	-	0	-	-
10		+++	5,5 ± 0,89	100	Hijau kekuningan	Remah
20		+++	5,3 ± 0,83	100	Hijau kecoklatan	Remah
30		++++	5,5 ± 1,21	100	Hijau kecoklatan	Remah
40		+++	5,0 ± 0,54	100	Hijau kecoklatan	Remah

Keterangan: Data dinyatakan dalam rerata ± SD (standar deviasi). Hasil uji ANOVA menunjukkan data tidak berbeda secara signifikan dengan nilai signifikansi ≥ 5% . (* Jumlah ulangan : 5)

Berdasarkan hasil pada Tabel 3, penambahan sukrosa pada berbagai konsentrasi (10 – 40 mg/L) ke dalam media MS tidak mempengaruhi waktu inisiasi kalus secara signifikan. Hal ini ditunjukkan melalui rerata waktu inisiasi terbentuknya kalus berlangsung selama 5,0 ± 0,54 - 5,5 ± 0,89 HST , kecuali pada kontrol karena tidak terbentuk kalus. Inisiasi kalus ditandai dengan munculnya sel-sel yang berukuran kecil pada bagian bekas irisan atau luka eksplan. Berdasarkan hasil ini, dapat diindikasikan bahwa variasi konsentrasi sukrosa tidak berpengaruh secara signifikan terhadap waktu inisiasi kalus melainkan karena adanya interaksi antara ZPT 2,4-D dan kinetin yang ditambahkan ke dalam media MS yang dapat menstimulus inisiasi kalus. Hasil penelitian ini sejalan dengan Sudrajad *et al.* (2016) yang membuktikan bahwa penambahan berbagai

konsentrasi sukrosa ke dalam media yang berisi 2 ppm hormon 2,4-D tidak mampu menginduksi pembentukan kalus melainkan eksplan mengalami nekrosis. Penggunaan ZPT 2,4-D dan kinetin dapat menstimulasi pertumbuhan kalus *T. paniculatum*. Konsentrasi 2,4-D dan kinetin yang digunakan pada penelitian merupakan kondisi optimal pada penelitian terdahulu (Herman, 2019). Selain faktor ZPT, pembentukan kalus yang baik umumnya diperoleh dari eksplan dengan jaringan muda dan sehat yang bersifat meristematik atau aktif dalam membelah dimana jaringan ini dapat memicu jaringan dalam regenerasi sel dengan cepat (Waryastuti *et al.*, 2017).

Secara morfologi, konsentrasi sukrosa berpengaruh terhadap perubahan warna namun tidak berpengaruh terhadap tekstur kalus *T. paniculatum*. Perbedaan dapat dilihat pada variasi

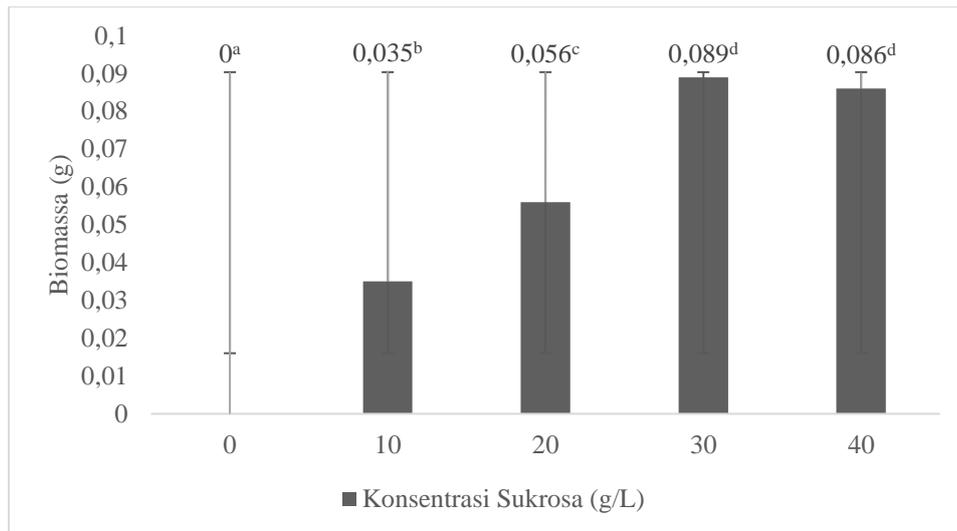
konsentrasi sukrosa 10 g/L, 20 g/L, 30 g/L dan 40 g/L terhadap warna kalus. Semakin tinggi konsentrasi sukrosa menyebabkan warna kalus menjadi kecoklatan. Hal ini dibuktikan pada konsentrasi sukrosa 10 g/L menghasilkan warna hijau kekuningan sedangkan pada konsentrasi sukrosa 40 g/L menghasilkan warna hijau kecoklatan. Kalus yang berwarna hijau mengindikasikan bahwa kalus tersebut mengandung klorofil (Kherasani *et al.*, 2017) sedangkan kalus yang berwarna coklat mengindikasikan bahwa sel penyusun kalus mengalami penuaan dan terjadi akumulasi senyawa fenolik yang teroksidasi sehingga membentuk warna kecoklatan. Pembentukan warna hijau pada kalus *T.paniculatum* dapat disebabkan karena interaksi hormon kinetin dan 2,4-D terhadap perkembangan kalus. Pada konsentrasi yang tepat, kinetin berperan dalam perkembangan klorofil dalam kalus (Sari *et al.*, 2018) Selain itu, kecoklatan pada kalus dapat terjadi karena hilangnya kadar air pada kalus akibat tekanan osmotik yang tinggi pada media yang dapat menyebabkan *browning* (Matheka *et al.*, 2008). Tekanan osmotik dapat menurunkan kinerja sel dalam pertumbuhan dan perkembangan yang dapat menyebabkan sel mengalami plasmolisis (Inayah, 2015). *Browning* terjadi pada kalus yang ditumbuhkan pada media dengan penambahan sukrosa 40 g/L yang disebabkan oleh pembentukan senyawa fenolik pada kalus. Akumulasi senyawa fenolik bersifat toksik bagi kalus dan selanjutnya dapat menghentikan pertumbuhan kalus (Hutami, 2008). Selain itu, faktor eksternal seperti paparan cahaya berpengaruh pada pigmentasi dari kalus dimana secara perlahan kalus yang berwarna putih akan menghasilkan proto klorofil yang dibantu oleh paparan cahaya (Julianti *et al.*, 2021). Menurut Taranto *et al.* (2017), cahaya meningkatkan proses oksidasi senyawa fenolik yang disebabkan oleh enzim polifenol oksidase yang menyebabkan pencoklatan pada kalus.

Hasil pada Tabel 3 menunjukkan bahwa penambahan sukrosa pada berbagai konsentrasi (10 – 40 g/L) menyebabkan kalus tumbuh dengan tekstur remah. Tekstur kalus terdiri dari 3 jenis yaitu remah, kompak dan intermediet. Kalus dengan tekstur remah mengandung banyak air, dinding sel belum mengalami lignifikasi dan sel mudah dipisahkan (Ulva *et al.*, 2019). Kalus yang

bertekstur remah pada dasarnya tidak berwarna atau transparan jika disinari karena kandungan air yang tinggi. Tipe kalus dengan tekstur remah merupakan kalus yang ideal digunakan dalam proses perbanyakan biomassa melalui kultur suspensi sel karena mudah dipisahkan. Kalus kompak memiliki karakteristik yang berlawanan dengan remah dimana kalus bertekstur kompak umumnya padat dan keras. Hal tersebut disebabkan karena susunan dari sel-sel kecil yang rapat dan sulit untuk dipisahkan (Julianti *et al.*, 2021). Tipe kalus padat merupakan kalus yang ideal digunakan dalam produksi metabolit sekunder (Retnaningati *et al.*, 2021). Pada kalus dengan tekstur intermediet atau semi-remah merupakan perpaduan antara kalus dengan tekstur remah dan kompak dimana kalus bertekstur intermediet dapat disebabkan oleh pengaruh ZPT 2,4-D yang bekerja secara sinergis dengan hormon endogen kemudian merangsang pembentukan tekstur kalus semi-remah (Widyarso, 2010). Tekstur kalus dapat mengalami perubahan selama tahap perkembangan. Faktor yang mempengaruhi pembentukan tekstur kalus yaitu interaksi ZPT, komposisi media, jenis eksplan hingga kondisi lingkungan dari kultur tersebut (Ulva *et al.*, 2019).

Pengaruh Sukrosa terhadap Biomassa Kalus *T. paniculatum*

Berat kering kalus digunakan untuk merepresentasikan biomassa kalus karena dapat memberikan gambaran mengenai kadar bahan organik dan mineral yang terkandung dalam sel yang berperan dalam pertumbuhan dan perkembangan kalus (Shofiyanti dan Purnawanto, 2017). Biomassa dipengaruhi oleh kecepatan pembelahan dan kemampuan pembesaran sel membentuk jaringan (Safitri *et al.* 2017). Berdasarkan hasil pada Gambar 2, menunjukkan bahwa pemberian sukrosa pada konsentrasi yang berbeda secara signifikan mempengaruhi biomassa kalus kecuali pada konsentrasi 30 dan 40 g/L. Semakin tinggi konsentrasi sukrosa yang ditambahkan ke dalam media menyebabkan peningkatan biomassa kalus *T.paniculatum* selama 28 hari kultur sebesar (0,035 – 0,089 g). Konsentrasi sukrosa sebesar 30 dan 40 g/L tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan terhadap biomassa kalus (0,089 g dan 0,086 g).

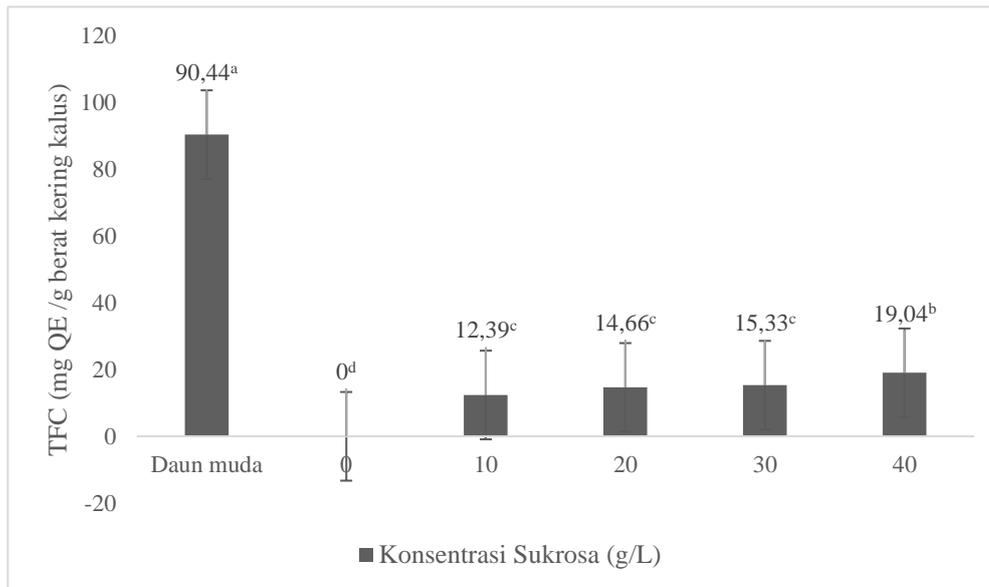


Gambar 2. Pengaruh konsentrasi sukrosa terhadap biomassa kalus *T. paniculatum* pada 28 HST. (Keterangan : angka yang diikuti huruf berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan antar perlakuan)

Gambar 2 menunjukkan konsentrasi sukrosa 30 g/L menghasilkan biomassa yang lebih tinggi dibandingkan konsentrasi sukrosa (10, 20 & 40 g/L). Hal ini disebabkan karena konsentrasi sukrosa 30 g/L merupakan konsentrasi yang optimal bagi sel dalam pembentukan biomassa (Irmawati *et al.*, 2007). Penelitian ini sejalan dengan Shofiyani dan Purnawanto (2017), dimana konsentrasi 30 g/L sukrosa menyebabkan peningkatan berat kering kalus sebesar 0,151 g dibandingkan dengan konsentrasi 20 g/L dan 40 g/L. Hal tersebut dapat dijelaskan bahwa semakin tinggi konsentrasi sukrosa dapat meningkatkan pertumbuhan kalus hingga batas yang optimal, namun setelahnya sukrosa dapat menurunkan pertumbuhan kalus. Sukrosa juga berperan dalam sintesis protein dimana semakin tinggi konsentrasi sukrosa maka sintesis protein semakin optimal. Sintesis protein dipicu oleh aktivitas respirasi sel maka semakin rendah konsentrasi sukrosa juga akan menurunkan laju respirasi sel dan menghambat proses sintesis protein (Wahyuni *et al.*, 2020). Hasil penelitian ini berbanding terbalik dengan Julianti *et al.* (2021), yang melaporkan bahwa penambahan sukrosa pada konsentrasi yang lebih tinggi yaitu sebesar 40 g/L menghasilkan perbedaan respon pertumbuhan kalus yang optimal berdasarkan berat basah dan berat kering kalus yang tinggi pada eksplan *S. lycopersicum*. Perbedaan tersebut dapat disebabkan oleh beberapa faktor salah satunya adalah jenis eksplan yang digunakan dimana setiap jenis tanaman memiliki respon pertumbuhan yang berbeda-beda.

Pengaruh Sukrosa terhadap Total Flavonoid Content (TFC) Kalus *T. paniculatum*

Gambar 3 menunjukkan bahwa penambahan sukrosa pada berbagai konsentrasi menyebabkan peningkatan produksi flavonoid (TFC) pada kalus secara signifikan jika dibandingkan kontrol (tanpa penambahan sukrosa) ($P < 0,05$). Semakin tinggi konsentrasi sukrosa (10 – 40 g/L) menyebabkan semakin tinggi nilai TFC yang menggambarkan produksi flavonoid pada kalus *T. paniculatum* yaitu sebesar (12,39 – 19,04 mg QE/g berat kering kalus). Namun jika dibandingkan dengan ekstrak daun *T. paniculatum ex-vitro*, nilai TFC menunjukkan hasil yang secara signifikan lebih tinggi dibandingkan TFC pada kalus dari berbagai variasi konsentrasi sukrosa yaitu sebesar 90,44 mg QE/g berat kering kalus. Hasil ini mengindikasikan bahwa produksi flavonoid sangat dipengaruhi level diferensiasi sel, jaringan atau organ suatu tanaman. Hasil penelitian ini sejalan dengan Kolarević *et al.* (2021) yang melaporkan bahwa nilai TFC dari daun Blueberry *ex-vitro* lebih tinggi ($18,56 \pm 0,98$ mg CE/g DW) dibandingkan TFC yang dihasilkan oleh kultur kalus Blueberry ($1,31 \pm 0,98$ mg CE/g DW). Meskipun nilai TFC kalus *T. paniculatum* lebih rendah dibandingkan dengan TFC dari ekstrak daun *T. paniculatum ex-vitro*, namun nilai TFC yang dihasilkan dari kalus *T. paniculatum* masih lebih tinggi (19,04 mg QE/g berat kering kalus) jika dibandingkan TFC kalus Blueberry ($1,31 \pm 0,98$ mg CE/g DW) dan TFC pada kalus *Sophora flavescens* yaitu sebesar ($5,40 \pm 0,56^b$ mg QE/g DW)



Gambar 3. Pengaruh konsentrasi sukrosa terhadap akumulasi kandungan total flavonoid (TFC) kalus *T. paniculatum* pada 28 HST. (Keterangan : angka yang diikuti huruf berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan antar perlakuan)

Flavonoid merupakan salah satu metabolit sekunder yang umum dihasilkan hampir di seluruh bagian tanaman. Senyawa ini termasuk ke dalam kelompok senyawa fenolik yang umumnya dikaitkan terbentuk atau muncul sebagai pertahanan tumbuhan (Anggraito *et al.*, 2018). Adanya peningkatan metabolit sekunder dapat disebabkan tumbuhan merespon terhadap perubahan pada lingkungannya yang potensial sebagai bentuk cekaman. Pada kasus ini, sukrosa pada konsentrasi yang tinggi dapat menyebabkan stress atau cekaman abiotik bagi kalus karena adanya perbedaan tekanan osmotik antara kalus dengan lingkungannya yaitu media kultur. Berdasarkan hasil pada Gambar 3, perlakuan konsentrasi sukrosa 40 g/L merupakan konsentrasi yang optimal dalam meningkatkan produksi TFC pada kalus *T. paniculatum* (19,04 mg QE/g berat kering kalus) dibandingkan dengan perlakuan konsentrasi sukrosa yaitu 30 g/L (15,33 mg QE/g berat kering kalus), 20 g/L (14,66 mg QE/g berat kering kalus) dan 10 g/L (12,29 mg QE/g berat kering kalus).

Hal tersebut sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Irmawati *et al.* (2007) dimana pada konsentrasi sukrosa 40 g/L menunjukkan kandungan flavonoid tertinggi dibandingkan dengan konsentrasi sukrosa 20 g/L dan 30 g/L. Hal ini dapat disebabkan karena penggunaan sukrosa dengan konsentrasi yang tinggi dapat menstimulasi cekaman bagi sel dimana respon ini dapat mempengaruhi jalur biosintesis flavonoid. Pada konsentrasi sukrosa (10, 20) g/L menunjukkan

hasil TFC yang rendah yang disebabkan karena sukrosa digunakan dalam untuk pertumbuhan dan perkembangan sel (Julianti *et al.*, 2021). Biosintesis flavonoid terjadi melalui jalur asam shikimat dan jalur asam malonat dimana keduanya akan aktif apabila terdapat suplai karbon dari lingkungan meningkat. Sukrosa merupakan penyedia sumber karbon dalam teknik perbanyakan *in vitro* sebagai pengganti CO₂ di lingkungan asli tanaman. Peningkatan sukrosa selanjutnya menyebabkan peningkatan karbon yang mengaktifkan metabolisme karbon dengan cepat. Jalur asam sikimat dipicu oleh proses pembentukan eritrosa-4-fosfat dan proses metabolisme karbon, kemudian dihasilkan produk asam amino aromatik dan senyawa fenolik sedangkan jalur asam malonat yang dibentuk oleh asetil ko-A dan merespon pembentukan senyawa flavonoid (Taiz & Zeiger, 2015).

4. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa konsentrasi sukrosa 30 g/L merupakan konsentrasi yang optimal dalam meningkatkan biomassa kalus sebesar 0,081 g berat kering kalus. Konsentrasi sukrosa 40 g/L terbukti meningkatkan TFC kalus sebesar 19,04 mg QE/g berat kering kalus. Hasil penelitian ini merupakan informasi yang penting dalam upaya menentukan kondisi optimal untuk peningkatan biomassa dan

produksi flavonoid melalui kultur kalus *T.paniculatum*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis berterima kasih kepada Fakultas Bioteknologi Universitas Kristen Duta Wacana Yogyakarta yang telah mendanai penelitian ini. Selain itu, penulis juga berterima kasih kepada Laboratorium Bioteknologi Dasar Lantai II dan staf laboran yang telah mendukung penyediaan sarana dan membantu proses penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Anggraito, Y. U., Susanti, R., Iswari, R. S., Yuniastuti, S., Lisdiana, W, H. N., . . . Bintari, S. H. (2018). *Metabolit Sekunder Dari Tanaman : Aplikasi dan Produksi*. Semarang: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam UNNES.
- Arifin, B., & Ibrahim, S. (2018). Struktur, Bioaktivitas dan Antioksidan Flavonoid. *Jurnal Zarah*, 21-29.
- Bakyyi, C. (2005). Embriogenesis Somatik Jahe (*Zingiber officiale* Rosc.) Pada Berbagai Zat Pengatur Tumbuh. *Tesis*. Pascasarjana. IPB. Bogor.
- Bhojwani, S. S., & Dantu, P. K. (2012). *Plant Tissue Culture: An Introductory Text*. Agra: Springer.
- Chandran, H., Meena, M., Barupal, T., & Sharma, K. (2020). Plant tissue culture as a perpetual source for production of industrially important bioactive compounds. *Biotechnology Reports*, 26, e00450. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00450>
- Erin, N. N., Junairiah, & Manuhara, Y. S. (2020). The Effect of IBA and Ethepon on Growth and Saponin Content of *Talinum paniculatum* Gaertn. Adventitious Root In Vitro. *Eco. Env. & Cons.*, 9-13.
- Fauziyyah, D., T, H., & Kamsinah. (2012). Upaya Memacu Pembentukan Kalus Eksplan Embrio Kedelai (*Glycine max* (L.) Merrill) Dengan Pemberian Kombinasi 2,4 D dan Sukrosa Secara Kultur In Vitro. *Jurnal Pembangunan Pedesaan*, 30-37.
- Herman, K. N. (2019). OPTimasi sterilisasi dan induksi kalus pada Ginseng Jawa (*Talinum paniculatum*, Gaertn.). Yogyakarta: Skripsi: Fakultas Bioteknologi Universitas Kristen Duta Wacana.
- Hutami, S. (2008). Masalah Pencoklatan pada Kultur Jaringan. *Jurnal AgroBiogen*, 83-88.
- Inayah, T. (2015). Pengaruh Konsentrasi Sukrosa pada Induksi Embrio Somatik Dua Kultivar Kacang Tanah (*Arachis hypogaea* L.) secara In Vitro. *Jurnal Agribisnis*, 61-70.
- Irmawati, Solichatun, & Anggarwulan, E. (2007). Pertumbuhan dan kandungan reserpin kultur kalus *Rauwolfia verticillata* pada variasi konsentrasi sukrosa dalam media MS. *Biofarmasi*, 38-46.
- Julianti, R. F., Nurchayati, Y., & Setiari, N. (2021). Pengaruh KOnsentration SUkrosa dalam Medium MS terhadap Kandungan Flavonoid Kalus Tomat (*Solanum lycopersicum*syn. *Lycopersicon esculentum*). *Jurnal Metamorfosa : Jurnal of Biological Sciences*, 141-149.
- Karjadi, A. K., & Buchory, A. (2008). Pengaruh Komposisi Media Dasar, Penambahan BAP, dan Pikloram terhadap Induksi Tunas Bawang Merah. *J. Hort.*, 1-9.
- Khan, T., Abbasi, B. H., Zeb, A., & Ali, G. S. (2018). Carbohydrate-Induced Biomass Accumulation and Elicitation of Secondary Metabolites in Callus Cultures of *Fagonia indica*. *Industrial Crops & Products*, 168-176.
- Kherasani, I., Prihastanti, E., & Haryanti, S. (2017). Pertumbuhan Kalus Eksplan Rimpang Jahe Merah (*Zingiber officinale* Rosc.) pada Berbagai Konsentrasi Sukrosa Secara In Vitro. *Buletin Anatomi dan Fisiologi*, 43-49.
- Kolarević, T., Milinčić, D. D., Vujović, T., Gašić, U. M., Prokić, L., Kostić, A., Cerović, R., Stanojevic, S. P., Tešić, Ž. L., & Pešić, M. B. (2021). Phenolic compounds and antioxidant properties of field-grown and in vitro leaves, and calluses in blackberry and blueberry. *Horticulturae*, 7(11). <https://doi.org/10.3390/horticulturae7110420>
- Linardi, M., Restiani, R., & Aditiyarini, D. (2022). Pengaruh Asam Salisilat Terhadap Kandungan Flavonoid Pada Kultur Kalus Ginseng Jawa (*Talinum paniculatum* (Jacq.) Gaertn.). *EduMatSains: Jurnal Pendidikan, Matematika dan Sains*, 443-458.
- Matheka, J. M., Magiri, E., Rasha, A. O., & Machuka, J. (2008). In Vitro Selection and

- Characterization of Drought Tolerance Somaclones of Tropical Maize (*Zea mays* L.). *Journal of Biotechnology*, 641-650.
- Ningsih, I. Y. (2014). Pengaruh Elisitor Biotik dan Abiotik Pada Produksi Flavonoid Melalui Kultur Jaringan Tanaman. *Pharmacy*, 117-132.
- Pangestika, D., Samanhudi, & Triharyanto, E. (2015). Kajian Pemberian IAA dan Paclobutrazol terhadap Pertumbuhan Eksplan Bawang Putih. *JKB*, 34-47.
- Park, J. S., Seong, Z. K., Kim, M. S., Ha, J. H., Moon, K. B., Lee, H. J., . . . Kim, . H. (2020). Production of Flavonoids in Callus Cultures of *Sophora flavescens* Aiton. *Plants*, 1-13.
- Praptiningsih & Soertojo, I. (2014). Respon Pertumbuhan Umbi Ginseng Jawa (*Talinum paniculatum* Gaertn.) pada Berbagai Media. *Agritrop Jurnal Ilmu-Ilmu Pertanian*, 36-39.
- Radha, R. K., Shereena, S. R., Divya, K., Krishnan, P. N., & Seeni, S. (2011). In Vitro Propagation of *Rubia cordifolia* Linn., A Medicinal Plant of The Western Ghats. *International Journal of Botany*, 90-96.
- Retnaningati, D., Hermanto, H., Purwijantingsih, E., & Solle, H. R. L. (2021). Pertumbuhan Kalus dan Produksi Katekin pada Kultur In Vitro Kalus Teh (*Camelia Sinensis* L.) dengan Penambahan Elisitor Ca²⁺ dan Cu²⁺. *Biota: Jurnal Ilmiah Ilmu-Ilmu Hayati*, 6(September), 192–202. <https://doi.org/10.24002/biota.v6i3.5278>
- Safitri, S. K., Siregar, L. A., & Lubis, K. (2017). Induksi Kalus Tanaman Rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) pada Jenis Eksplan dan Konsentrasi Auksin yang Berbeda. *Jurnal Agroekoteknologi*, 593-598.
- Sari, Y., Kusumawati, E., Saleh, S., Kustiawan, W., & Sukarningsih. (2017). Induksi Kalus Tanaman Rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) pada jenis Eksplan dan Konsentrasi Auksin yang Berbeda. *Jurnal Agroekoteknologi*, 593-598.
- Sartika, S., & Santosa. (2012). Pengaruh Kombinasi Zat Pengatur Tumbuh (2,4 D dan Kinetin) terhadap Pertumbuhan dan Kandungan Metabolit Sekunder pada Kalus *Phaleria macrocarpa* (Sceff.) Boerl.). *Jurnal Tumbuhan Obat Indonesia*, 1-10.
- Shofiyani, A., & Purnawanto, M. (2017). Pertumbuhan Kalus Kencur (*Kaemferia galanga* L.) Pada Komposisi Media Dengan Perlakuan Sukrosa dan Zat Pengatur Tumbuh (2,4 D dan Benzil Aminopurin). *AGRITECH*, 55-64.
- Sitorus, E. N., Hastuti, E. D., & Setiari, N. (2011). Induksi Kalus Binahong (*Basella rubra* L.) Secara In Vitro Pada Media Murashige & Skoog Dengan Konsentrasi Sukrosa yang Berbeda. *Bloma*, 1-7.
- Smith, R. H. (2000). *Plant Tissue Culture, Techniques and Experiment: Second Edition*. San Diego San Fransisco: Academic Press.
- Sudrajad, H., Suharto, D., & Wijaya, N. R. (2016). Inisiasi Kalus Sanrego (*Lunasia amara* Blanco.) dalam Kultur Jaringan. *Proceeding Biology Education Conference* (pp. 691-623). Surakarta: FKIP UNS.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2015). *Plant Physiology and Development: Six Edition*. Sunderland: Sinaur Associates, Inc.
- Taranto, F., Pasqualone, A., Mangini, G., Tripodi, P., Miazzi, M. M., Pavan, S., & Montemurro, C. (2017). Polyphenol Oxidases in Crops: Biochemical, Physiological and Genetic Aspects. *International Journal of Molecular Sciences*, 1-16.
- Ulva, M., Nurchayati, Y., Prihastanti, E., & Setiari, N. (2019). Pertumbuhan Kalus Tomat (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Varietas Permata F1 dari Jenis Eksplan dan Konsentrasi Sukrosa yang Berbeda secara In Vitro. *Life Science*, 160-169.
- Wahyuni, D. K., Huda, A., Faizah, S., Purnobasuki, H., & Wardojo, B. P. (2020). Effects of light, sucrose concentration and repetitive subculture on callus growth and medically important production in *Justicia gendarussa* Burm.f. *Biotechnology Report*, 1-9.
- Wardani, D. P., Solichatun, & Setyawan, A. D. (2004). Pertumbuhan dan Produksi Saponin Kultur Kalus *Talinum paniculatum* Gaertn. pada Variasi Penambahan Asam 2.4 Diklorofenoksi Asetat (2,4 D) dan Kinetin. *Biofarmasi*, 35-43.
- Waryastuti, D. E., Setyobudi, L., & Wardiyati, T. (2017). Pengaruh Sukrosa Terhadap Pertumbuhan Eksplan Tanaman Kedelai Hitam (*Glycine soja*) Secara In Vitro. *Agroteknologi*, 140-149.
- Widyarso, M. (2010). Kajian Penggunaan BAP dan IBA Untuk Merangsang Pembentukan

Tunas Lengkeng (*Dimocarpus longan* Lour.) Varietas Pingpong Secara In Vitro. *Skripsi*. Universitas Sebelas Maret.

Wijaya, R., Restiani, R., & Aditiyarini, D. (2020). Wijaya, R., Restiani, R., Aditiyarini, D. 2020. Pengaruh Kitosan Terhadap Produksi Saponin Kultur Daun Ginseng (*Talinum paniculatum* (Jacq.) Gaertn.). *Prosiding Seminar Nasional Biologi. Prosiding Seminar Nasional Biologi di Era Pandemi COVID-19* (pp. 253-263). Gowa: Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, UIN Alauddin Makassar.

Yuniardi, F. (2019). Aplikasi DIMMER Switch pada Rak Kultur Sebagai Pengatur Kebutuhan Intensitas Cahaya Bagi Tanaman In Vitro. *Indonesian Journal of Laboratory*, 8-13.