

Elisitasi Flavonoid menggunakan Kitosan pada Kultur Kalus Ginseng Jawa (*Talinum paniculatum* Gaertn.)

Elicitation of Flavonoid by using Chitosan in Callus Culture of Javanese Ginseng (Talinum paniculatum Gaertn.)

Inawati Eddijanto¹, Ratih Restiani^{1*}, dan Dwi Aditiyarini¹

¹Fakultas Bioteknologi, Universitas Kristen Duta Wacana, Yogyakarta, Indonesia

Abstrak

Ginseng Jawa (*Talinum paniculatum* Gaertn.) sering dimanfaatkan dalam pengobatan herbal karena mengandung flavonoid yang berkhasiat sebagai antivirus, antiinflamasi, kardioprotektif, antidiabetes, antikanker, dan antioksidan. Kultur *in vitro* adalah teknik yang dapat meningkatkan produksi metabolit sekunder melalui elisitasi. Elisitasi metabolit sekunder dengan menggunakan kitosan dapat digunakan untuk menghasilkan flavonoid dan bekerja langsung pada enzim kunci penghasil flavonoid. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh konsentrasi kitosan dan durasi elisitasi terhadap biomassa kalus dan akumulasi flavonoid. Inisiasi kalus *T. paniculatum* dilakukan menggunakan eksplan daun yang diinokulasi dalam media MS dengan penambahan 3 mg/L kinetin dan 2 mg/L 2,4-D. Kalus berusia 58 hari (fase *early* stasioner) dielisitasi dengan variasi konsentrasi kitosan 0, 50, 150, dan 200 ppm dan durasi elisitasi 0, 24, 48, dan 96 jam. Ekstraksi kalus menggunakan metanol 96% dilanjutkan analisis secara kualitatif dan semi kuantitatif menggunakan KLT. Peningkatan konsentrasi dan durasi elisitasi kitosan secara umum menyebabkan penurunan biomassa kalus (0,051-0,066 g/g BK) dibandingkan kontrol (0,067 g/g BK). Selain itu, peningkatan konsentrasi dan durasi elisitasi kitosan berpengaruh terhadap peningkatan akumulasi flavonoid berdasarkan luas noda KLT (0,082 - 0,1178) cm² dibandingkan kontrol (0,0785 cm²). Konsentrasi dan durasi elisitasi kitosan yang optimal meningkatkan biomassa kalus (0,068 g/g BK) adalah kitosan konsentrasi 150 ppm selama 24 jam (K₂W₁) sedangkan akumulasi flavonoid optimal (0,1178 cm²) dan intensitas warna noda KLT bernilai 5 (kuning kehijauan gelap) pada perlakuan kitosan 150 ppm selama 48 jam (K₂W₂).

Kata kunci: Elisitasi, flavonoid, kultur kalus, kitosan, *Talinum paniculatum*

Abstract

Javanese ginseng (Talinum paniculatum Gaertn.) is often used in herbal medicine because it contains flavonoids that have antiviral, anti-inflammatory, cardioprotective, antidiabetic, anticancer, and antioxidant properties. In vitro culture is a technique that can increase the production of secondary metabolites through elicitation. Elicitation of secondary metabolites by using chitosan can be used to produce flavonoids and act directly on enzymes that produce flavonoids. This study aims to determine the effect of chitosan concentration and elicitation duration on callus biomass and flavonoid accumulation. Callus initiation was carried out using leaf explants inoculated in MS medium with the addition of 3 mg/L kinetin and 2 mg/L 2,4-D. Callus aged 58 days (early stationary phase) were elicited with variation in chitosan concentration (0, 50, 150, and 200) ppm and elicitation durations (0, 24, 48, and 96) hours. Callus extraction using 96% methanol was followed by qualitative and semi-quantitative analysis using TLC. In general, increasing the concentration of chitosan and duration of elicitation caused a decrease in callus biomass (0.051-0.066 g/g DW) compared to control (0.067 g/g DW). In addition, increasing the concentration and elicitation duration of chitosan increased the accumulation of flavonoids based on the area of the TLC stain (0.082 - 0.1178) cm² and the color intensity of the TLC stain was 5 (dark green) compared to the control (0.0785 cm²). The optimal concentration and duration of elicitation of chitosan to increase callus biomass (0.068 g/g BK) was 150 ppm chitosan for 24 hours (K₂W₁) while the optimal accumulation of flavonoids (0.1178 cm²) and color intensity of the TLC stain was 5 (dark yellow greenish) was treated with 150 ppm chitosan for 48 hours (K₂W₂).

Keywords: Flavonoid, callus culture, chitosan, elicitation, *Talinum paniculatum*

*Corresponding author:

Ratih Restiani

Fakultas Bioteknologi, Universitas Kristen Duta Wacana,

Jl. Wahidin Sudirohusodo no. 5-25, Yogyakarta, Indonesia, 55224

E-mail : ratih.restiani@staff.ukdw.ac.id

Pendahuluan

Ginseng Jawa (*Talinum paniculatum* Gaertn.) banyak dijumpai di Indonesia dan sering dimanfaatkan dalam pengobatan herbal karena mengandung senyawa bioaktif pada setiap bagian tanamannya (Seswita, 2010). Ikhtimami (2012), menyatakan bahwa akar dan daun ginseng jawa mengandung metabolit sekunder seperti saponin, flavonoid, dan tanin. Flavonoid pada Ginseng Jawa memiliki aktivitas antioksidan, antikarsinogenik, antiproliferatif, antiinflamasi, dan antiestrogenik (Zuo *et al.*, 2009) (Guo *et al.*, 2012).

Secara alami, tanaman menghasilkan metabolit sekunder yang digunakan sebagai mekanisme pertahanan terhadap cekaman lingkungan yang bersifat abiotik maupun biotik. Kondisi lingkungan memiliki peran kunci dalam produksi senyawa metabolit. Selain itu, faktor internal seperti genotipe tanaman juga mempengaruhi kualitas dan kuantitas metabolit yang dihasilkan (Sitinjau *et al.*, 2015). Dengan demikian, metabolit yang dihasilkan tidak akan sama tergantung pada faktor internal dan eksternal dari tanaman tersebut.

Metode alternatif yang dapat digunakan untuk memproduksi flavonoid secara optimal adalah kultur *in vitro*. Keunggulan dari kultur *in vitro* adalah dapat memproduksi metabolit sekunder berkelanjutan dan *reliable* (Vanisree *et al.*, 2004). Kultur *in vitro* juga dapat menjaga kualitas dan kuantitas metabolit yang dihasilkan agar tetap sama karena mampu mengendalikan sebagian besar faktor internal dan eksternal dari tanaman yang digunakan.

Elisitasi merupakan metode peningkatan senyawa metabolit sekunder melalui penambahan elisitor. Elisitor adalah suatu molekul yang bekerja dengan menstimulasi pertahanan diri tanaman untuk menghasilkan senyawa metabolit tertentu sebagai bentuk dari respon stres (Namdeo, 2007).

Kitosan adalah satu jenis elisitor biotik yang berasal dari kulit Krustasea dan sering digunakan dalam produksi senyawa metabolit sekunder. Kitosan bekerja dengan memberi sinyal pada enzim spesifik untuk

mengkode pembentukan metabolit sekunder seperti lignin, flavonoid, dan fitoaleksin sebagai respon dari interaksi patogen dan tanaman (Jakubas & Nowak, 2022). Selain itu, kitosan memiliki sifat mudah diuraikan secara biologi sehingga aman untuk digunakan dan tidak menimbulkan efek toksik (Srisornkompon *et al.*, 2014). Kitosan banyak digunakan dalam produksi metabolit sekunder pada berbagai tanaman. Wijaya *et al.*, (2020) telah membuktikan efektifitas dan keamanan kitosan dalam menghasilkan saponin pada kultur kalus *T. paniculatum*. Selain saponin, *T. paniculatum* juga mengandung senyawa flavonoid yang memiliki potensi besar di bidang kesehatan karena aktivitas biologinya (Lestario *et al.*, 2009; Silalahi, 2022). Informasi mengenai pengaruh kitosan terhadap peningkatan biomassa dan produksi flavonoid masih terbatas sehingga penelitian ini penting untuk dilakukan sebagai dasar informasi untuk produksi flavonoid secara *in vitro* dalam skala yang lebih besar.

Materi dan Metode

Penelitian ini bersifat eksperimental menggunakan desain penelitian Rancangan Acak Lengkap Faktorial untuk menguji pengaruh variasi konsentrasi kitosan dan durasi elisitasi terhadap kandungan flavonoid kultur kalus *T. paniculatum*. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi Dasar II Fakultas Bioteknologi Universitas Kristen Duta Wacana, Yogyakarta. Alat yang digunakan adalah neraca analitik, pH meter, *autoclave* dan *Laminar Air Flow*, plat TLC GF254 (Merck). Bahan yang digunakan adalah eksplan daun *T. paniculatum* pada urutan ke-2 atau ke-3 dari pucuk yang sehat, tidak layu dan bebas dari hama yang dibudidayakan di Laboratorium Bioteknologi Dasar UKDW, medium Murashige dan Skoog (MS), kitosan, dan methanol 96%.

Persiapan Media MS

Media MS (Murashige & Skoog, 1962) dibuat dengan mencampurkan 10 mL larutan stok makronutrien, 1mL larutan stok mikronutrien, 5 mL larutan stok Iron, 4 mL larutan stok vitamin, 0,1 mg myo-

inositol, 3 g sukrosa, 30 mL kinetin (stok 100 ppm) dan 20 mL 2,4-D (stok 100 ppm) ke dalam erlenmeyer 2 L. Tambahkan akuades hingga volume mencapai 1000 mL dan diaduk hingga rata. pH diatur berkisar 5,7-5,8 dengan penambahan HCl atau NaOH. Sebanyak 8 g agar ditambahkan ke dalam campuran media sambil dipanaskan hingga larut atau berwarna transparan. Sebanyak 20 mL media dituangkan pada botol kultur yang digunakan, lalu ditutup rapat dengan *aluminium foil* dan dimasukkan ke dalam *autoclave* dengan tekanan 1 atm pada suhu 121°C selama 15 menit.

Persiapan Media Elisitasi

Media elisitasi dibuat dengan prosedur yang sama dengan media MS tetapi ditambahkan larutan kitosan dengan variasi konsentrasi kitosan (0, 50, 150, dan 200) ppm (dari stok kitosan konsentrasi 500 ppm pH 5,8). Sterilisasi media MS dan larutan stok kitosan dilakukan secara terpisah untuk mencegah terjadinya penggumpalan kitosan pada media. Media MS dan larutan stok kitosan steril dicampurkan dan dituang ke botol kultur secara aseptis dalam LAF.

Inokulasi Eksplan

Eksplan *T. paniculatum* yang digunakan adalah daun urutan ke-2 atau ke-3 dari pucuk yang kemudian dicuci dengan air mengalir. Setelah itu, daun dicuci dengan sabun cair (Sunlight) dan ditambahkan 2-3 tetes Tween 80. Eksplan dibilas di bawah air mengalir sampai tidak ada sisa sabun, lalu dibilas kembali menggunakan akuades steril dan diletakkan pada cawan petri steril. Sterilisasi eksplan dilakukan di dalam *Laminar Air Flow*. Eksplan direndam dalam alkohol 50% selama 3 menit. Eksplan dibilas dengan akuades steril sebanyak 3 kali. Eksplan yang sudah steril diletakkan di atas kertas saring steril pada petridish kemudian dipotong sebesar 1 x 1cm², lalu potongan eksplan diletakkan pada media MS secara aseptis. Setelah itu, botol ditutup dengan *aluminium foil* dan *plastic wrap*. Kultur dipelihara di ruang inkubasi pada suhu 25^o C, lama penyinaran 24 jam terang dan intensitas cahaya 1000 lux.

Pengamatan Fase Pertumbuhan Kalus

Penentuan fase pertumbuhan kalus merupakan fase penting yang menentukan optimalisasi elisitasi oleh kitosan. Dalam tahap ini dilakukan penimbangan berat basah kalus pada masing-masing botol kultur sejak hari ke-0 hingga hari ke-58. Pertumbuhan kalus pada eksplan dinyatakan dalam persentase pertumbuhan dengan rumus :

$$\% \text{ pertumbuhan} = \frac{\text{eksplan yang berhasil membentuk kalus}}{\text{total eksplan yang diinokulasi}} \times 100 \%$$

Elisitasi dan Penentuan Biomassa Kalus

Tahap elisitasi dilakukan dengan subkultur kalus berusia 58 hari (*early stationer*) ke dalam media MS yang telah ditambahkan kitosan pada berbagai konsentrasi dan durasi elisitasi (Tabel 1). Kalus yang telah selesai dielisitasi selanjutnya ditimbang (berat basah) dan dikeringkan dalam oven pada suhu 40^o C sampai diperoleh berat kering yang konstan. Data berat kering yang diperoleh merupakan data biomassa kalus.

Tabel 1. Kombinasi Perlakuan Kitosan dan Durasi Elisitasi.

Durasi Elisitasi (jam)	Konsentrasi Kitosan (ppm)		
	50	150	200
24	K ₁ W ₁	K ₁ W ₂	K ₁ W ₃
48	K ₂ W ₁	K ₂ W ₂	K ₂ W ₃
96	K ₃ W ₁	K ₃ W ₂	K ₃ W ₃

Keterangan : K : Kitosan, W: Durasi elisitasi

Ekstraksi Kalus

Ekstraksi kalus dilakukan dengan mengeringkan kalus dalam oven pada suhu 40°C selama 24 jam, lalu dihaluskan menggunakan *mortar*. Sebanyak 0,1g bubuk kalus direndam dalam 1 ml metanol 96% selama 12 jam. Larutan divortex dan didiamkan selama 24 jam. Filtrat disaring menggunakan kertas saring lalu diuapkan dengan *waterbath* suhu 60 °C hingga volume akhir filtrate 0,1 mL. Filtrat disimpan dalam mikrotube 1,5 mL.

Analisis Flavonoid menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Analisis kandungan flavonoid dalam ekstrak methanol kalus dilakukan dengan

mengambil 3 μl ekstrak sampel yang kemudian diteteskan di atas plat silika gel GF254. Plat sampel dielusi menggunakan solven metanol dan air dengan perbandingan 7:3 sampai solven bergerak ke bagian atas plat. Plat dikeringkan dan disemprot reagen AlCl_3 1%, lalu diamati penampakan warna yang terjadi dimana warna kuning kehijauan menunjukkan adanya flavonoid. Identifikasi noda KLT dilakukan dengan menghitung nilai *Retention factor* (Rf). Perhitungan nilai Rf dilakukan dengan menghitung jarak tempuh noda flavonoid untuk dijadikan acuan jenis flavonoid yang terbentuk. Kuantitas flavonoid ditentukan dengan penilaian intensitas warna dan perhitungan luas noda. Luas noda dihitung dengan mengukur jari-jari vertikal (a) dan horizontal (b) noda flavonoid dan dimasukkan dalam rumus luas oval ($\pi.a.b$). Selain itu, penilaian intensitas warna dilakukan berdasarkan skoring noda flavonoid (1-5) dari warna noda terang hingga gelap sebagai penilaian kuantitas flavonoid.

Analisis Data

Parameter yang diamati dan diukur dalam penelitian diantaranya adalah morfologi kalus meliputi tekstur dan

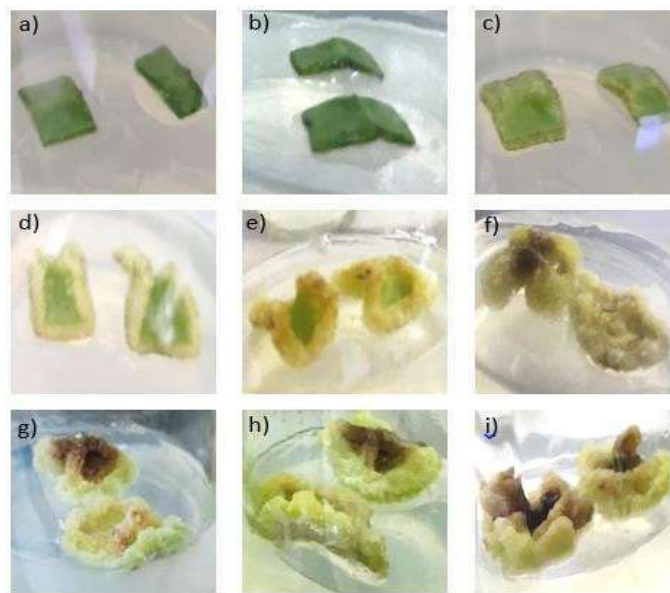
warna kalus, persentase pertumbuhan kalus, biomassa (berat kering kalus), dan akumulasi flavonoid (intensitas warna serta luas noda flavonoid). Data yang diperoleh selanjutnya diolah menggunakan *Microsoft Excel*, dianalisis secara deskriptif kualitatif serta disajikan dalam bentuk dokumentasi foto, tabel dan histogram.

Hasil

Inisiasi Pertumbuhan Kalus *T.paniculatum*

Inokulasi eksplan daun *T.paniculatum* ke dalam media MS yang telah ditambahkan kombinasi ZPT Kinetin dan 2,4-D menunjukkan respon pertumbuhan berupa inisiasi kalus (Gambar 1a-j). Kombinasi zpt tersebut telah dioptimalkan untuk memproduksi kalus dari eksplan daun *T.paniculatum* dengan kombinasi 3 mg/L kinetin dan 2 mg/L 2,4-D (Herman, 2019; Wijaya *et al.*, 2020).

Pertumbuhan kalus terlihat dimulai pada hari ke-6 yang ditandai dengan adanya pembengkakan di setiap tepi eksplan (Gambar 1c). Respon pertumbuhan kalus yang realtif cepat ini dapat disebabkan oleh kombinasi hormon 2,4-D dan kinetin pada konsentrasi yang optimal. Hormon 2,4-D memiliki peran kunci dalam inisiasi kalus sedangkan



Gambar 1. Pertumbuhan kalus *T.paniculatum* pada medium MS dengan penambahan 3 mg/L kinetin dan 2 mg/L 2,4-D selama 8 minggu inkubasi. Keterangan: a) Eksplan hari ke-0, b) Eksplan hari ke-4, c) Eksplan membengkak hari ke-6, kalus usia d) 14 hari, e) 28 hari, f) 36 hari, g) 42 hari, h) 48 hari, dan i) 58 hari.

kinetin dapat membantu pembelahan dan perbesaran kalus. Pembengkakan eksplan daun dapat dipicu oleh penyerapan cairan dan nutrisi yang terkandung dalam media masuk sehingga masuk ke dalam eksplan melalui luka sayatan (Rahayu *et al.*, 2003). Pada hari ke-14, eksplan tampak memiliki tekstur kompak dengan bagian tepi telah beregenerasi menjadi kalus berwarna putih kehijauan serta posisi sedikit terangkat ke atas (Gambar 1d). Warna hijau pada kalus mengindikasikan adanya pigmen klorofil dalam kalus, sedangkan warna putih menunjukkan aktivitas pembelahan sel (Wijaya *et al.*, 2020). Hari ke-28 kalus mulai berwarna hijau kekuningan dengan tepi berwarna putih serta ukuran kalus yang semakin membesar dan tekstur kalus yang kompak (Gambar 1e). Hari ke-36 kalus berwarna hijau kekuningan dengan tekstur kalus yang menjadi remah (Gambar 1f). Perubahan tekstur kalus tersebut dapat terjadi karena penyerapan cairan dan nutrisi yang semakin banyak dan mengakibatkan sel-sel menjadi kurang padat dan lembek (Wardani *et al.*, 2004). Hari ke-42, kalus terlihat berwarna hijau kekuningan dengan warna coklat di bagian tengahnya (Gambar 1g). Hari ke-48, kalus berwarna hijau kekuningan dan warna coklat yang lebih jelas, sedangkan pada hari ke-58, kalus berwarna hijau kecoklatan (Gambar 1h-i). Perubahan warna kalus menjadi hijau kecoklatan dapat disebabkan karena terjadi akumulasi senyawa fenolik dalam kalus.

Tabel 2 menunjukkan respon pertumbuhan kalus *T. paniculatum* selama 8

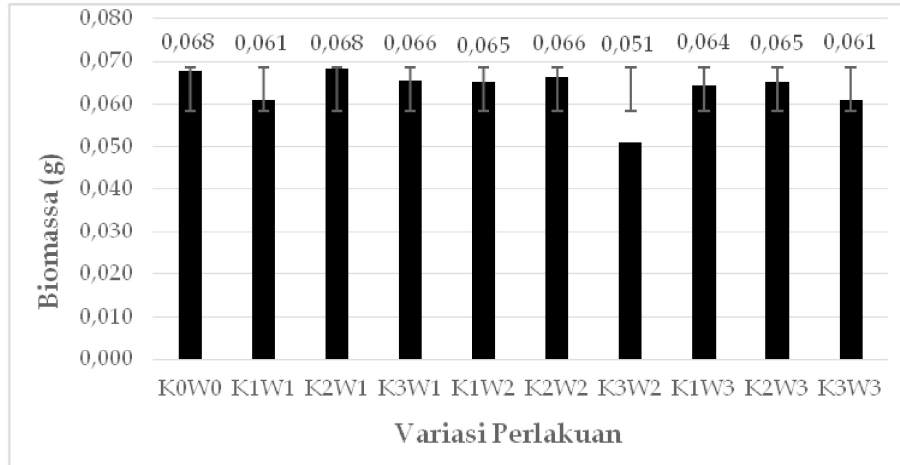
minggu inkubasi. Pada minggu ke-0, eksplan belum menunjukkan adanya pertumbuhan kalus (0%). Pada minggu ke-2, persentase pertumbuhan meningkat menjadi 75% yang menunjukkan sebagian besar eksplan telah tumbuh menjadi berwarna hijau dan bertekstur kompak. Pada minggu ke-3 persentase pertumbuhan kalus mencapai 100% yang menunjukkan seluruh eksplan telah tumbuh menjadi kalus. Persentase pertumbuhan kalus dapat berlangsung dengan cepat karena kombinasi eksplan daun yang masih berusia muda, jenis media, kombinasi jenis dan konsentrasi ZPT yang optimal sehingga hal ini meningkatkan kemampuan pertumbuhan dan perkembangan kalus *Talinum paniculatum*. Selain zpt, komponen senyawa yang terkandung dalam media MS seperti sukrosa, vitamin, mikronutrien, makronutrien dan lainnya juga sangat mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan kalus (Rahayu *et al.*, 2003).

Pengaruh Konsentrasi dan Durasi Elisitasi Kitosan terhadap Biomassa Kalus

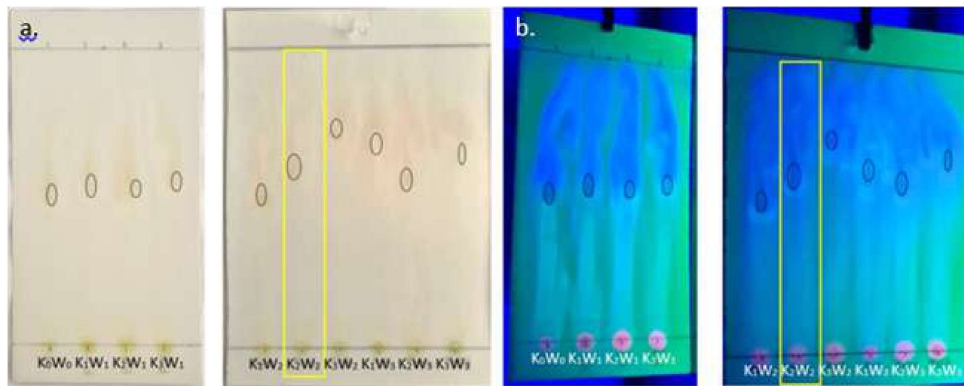
Biomassa merupakan salah satu indikator pertumbuhan yang diukur untuk melihat pengaruh konsentrasi kitosan dan durasi elisitasi terhadap kalus *T. paniculatum*. Dalam penelitian ini, biomassa diukur menggunakan dengan berat kering kalus (g). Gambar 2 menunjukkan bahwa konsentrasi kitosan dan durasi elisitasi secara umum menurunkan biomassa (berat kering) kalus dibandingkan dengan kontrol. Perlakuan K3W2 (kitosan 200 ppm selama 48 jam) menyebabkan penurunan biomassa kalus terbesar mencapai 23,8% dibandingkan kontrol, sedangkan perlakuan lainnya menunjukkan penurunan

Tabel 2. Persentase pertumbuhan dan morfologi kalus *T. paniculatum* pada medium MS +2,4-D 2 mg/L+Kinetin 3 mg/L selama 8 minggu inkubasi

Minggu	Parameter Pertumbuhan		
	Persentase pertumbuhan (%)	Tekstur kalus	Warna kalus
0	0	kompak	hijau
1	50	kompak	Hijau muda
2	75	kompak	Hijau muda
3	100	kompak	hijau kekuningan
4	100	kompak	hijau kekuningan
5	100	remah	hijau kekuningan
6	100	remah	hijau kekuningan
7	100	remah	hijau kecoklatan
8	100	remah	hijau kecoklatan



Gambar 2. Pengaruh konsentrasi kitosan dan durasi elisitasi terhadap biomassa kalus *T. paniculatum*.
Keterangan: K= Kitosan (0, 50, 150, dan 200) ppm, W= Durasi elisitasi (0, 24, 48, dan 96) jam.



Gambar 3. Luas noda flavonoid ekstrak methanol kalus *T. paniculatum*: a.) KLT setelah pemberian reagen AlCl₃ 1%, b.) KLT pada UV 315nm. Keterangan : garis elips menggambarkan luas noda flavonoid , kotak kuning menunjukkan luas noda terbesar

biomassa sebesar 1,5-8,9%. Hal ini sejalan dengan hasil penelitian Silalahi (2010), yang membuktikan bahwa pada konsentrasi elisitor dan durasi elisitasi tertentu mampu menekan pertumbuhan kalus.

Pengaruh Konsentrasi dan Durasi Elisitasi Kitosan terhadap Akumulasi Flavonoid

Pengaruh konsentrasi dan durasi elisitasi kitosan terhadap akumulasi flavonoid diukur secara kualitatif dan semi- kuantitatif. Analisis flavonoid secara kualitatif dilakukan dengan penilaian intensitas warna, sedangkan analisis semi kuantitatif dilakukan dengan pengukuran luas noda yang dapat dilihat pada Tabel 2 dan Gambar 3.

Analisis kualitatif kandungan flavonoid kalus *T. paniculatum* dilakukan melalui

penilaian intensitas warna dan perhitungan nilai R_f noda yang diduga sebagai flavonoid. Untuk memperjelas letak, ukuran, dan warna noda sampel dilakukan penyemprotan reagen AlCl₃ 1% dan pengamatan kromatogram pada sinar UV 315nm (Gambar 3). Penggunaan AlCl₃ merupakan metode kolorimetri yang bereaksi dengan gugus keton dan gugus OH sehingga menyebabkan terjadinya pergeseran panjang gelombang ke arah *visible* dan menghasilkan warna kuning. Metode kolorimetri tersebut dapat digunakan untuk menentukan kandungan flavonoid golongan flavon atau flavonol (Anwar & Triyasmono, 2016). Noda sampel pada KLT menunjukkan seluruh sampel memiliki noda berbentuk oval, berwarna kuning dengan bagian tengah

yang sedikit lebih gelap dan ketika bereaksi dengan reagen $AlCl_3$ terlihat warna noda yang menjadi lebih kuning.

Tabel 3. Nilai R_f dan Intensitas Warna Ekstrak Methanol Kalus *T. paniculatum*.

Perlakuan	Nilai R_f	Intensitas Warna
K_0W_0	0,501	5
K_1W_1	0,544	3
K_2W_1	0,526	4
K_3W_1	0,553	4
K_1W_2	0,510	4
K_2W_2	0,613	5
K_3W_2	0,714	3
K_1W_3	0,611	2
K_2W_3	0,576	2
K_3W_3	0,663	2

Keterangan : Skor 1 – 5 menunjukkan intensitas warna terang – gelap.

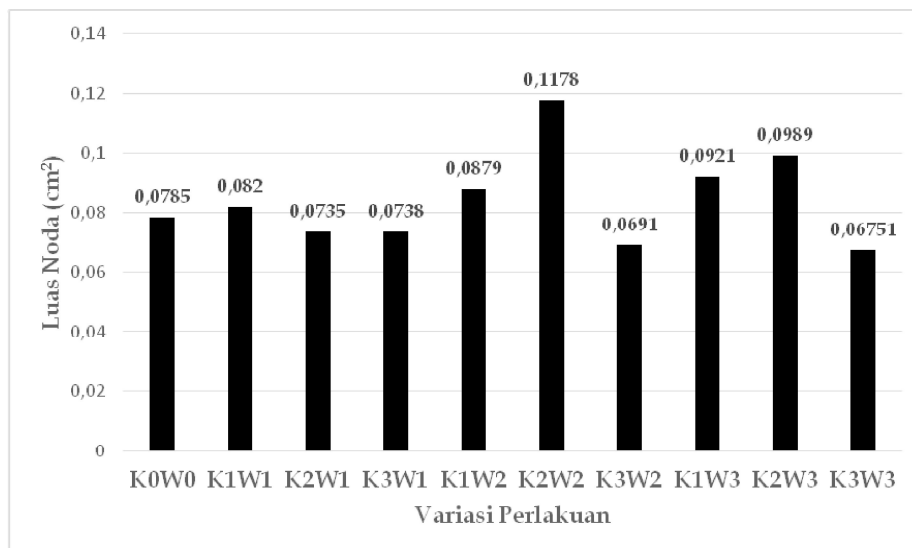
Intensitas warna noda sampel pada KLT (Gambar 3), menunjukkan kontrol (K_0W_0) dan perlakuan kitosan 150 ppm dengan durasi elisitasi 48 jam (K_2W_2) memiliki intensitas warna noda lebih gelap dengan skor 5. Intensitas warna gelap dengan skor 5 mengindikasikan kadar flavonoid yang lebih banyak dibandingkan noda dengan intensitas warna terang. Kombinasi perlakuan lainnya menunjukkan intensitas warna noda yang bervariasi antara 2 hingga 4 (Tabel 3). Intensitas warna noda hasil KLT tersebut menunjukkan gambaran kuantitas senyawa flavonoid yang dihasilkan dari

kombinasi perlakuan konsentrasi kitosan dan durasi elisitasi.

Pembahasan

Kalus merupakan massa sel yang masih aktif membelah dan belum terdiferensiasi. Kalus terbentuk sebagai respon jaringan yang mengalami perlukaan saat isolasi eksplan serta interaksi ZPT eksogen dengan hormon endogen yang terkandung dalam eksplan (Benjamin *et al.*, 2019). Prinsip dasar kultur kalus memanfaatkan sifat totipotensi tanaman yang membuat anakan kultur memiliki sifat yang sama dengan tanaman induk (Indah & Ermavitalini, 2013). Penambahan kinetin dari golongan sitokinin berperan dalam memicu pembelahan sel, sedangkan penambahan auksin seperti 2,4-D mampu merangsang pembelahan dan perbesaran sel sehingga dapat menstimulus pembentukan dan pertumbuhan kalus (Rahayu *et al.*, 2003). Penelitian ini menggunakan daun *T. paniculatum* yang masih muda dan terletak pada urutan ke- 2 – 3 dari pucuk sebagai eksplan. Daun muda memiliki jaringan meristematik yang bersifat aktif membelah sehingga kemampuan regenerasinya selnya lebih cepat (Karuppusamy, 2010).

Konsentrasi elisitor dan durasi elisitasi merupakan faktor yang dapat mempengaruhi pertumbuhan kalus (biomassa) dan produksi metabolit sekunder melalui kalus



Gambar 4. Pengaruh konsentrasi kitosan dan durasi elisitasi terhadap luas noda flavonoid ekstrak kalus *T. paniculatum*

(Ramirez-Estrada *et al.*, 2016). Biomassa kalus merupakan salah satu tahap penting dalam produksi metabolit sekunder secara *in vitro*, karena metabolit sekunder merupakan produk dari sel. Dengan kata lain, semakin tinggi biomassa yang dihasilkan maka semakin besar produk metabolit sekunder yang diperoleh dalam sistem kultur *in vitro*. Oleh karena itu, optimasi elisitor terhadap peningkatan biomassa kalus juga menjadi faktor penting yang perlu dilakukan. Berdasarkan hasil pada gambar 2, menunjukkan bahwa pemberian kitosan pada berbagai konsentrasi dan durasi elisitasi secara umum menyebabkan penurunan biomassa kalus jika dibandingkan kontrol. Hal ini dapat terjadi karena kitosan pada konsentrasi dan waktu elisitasi tertentu menyebabkan stres osmotik atau cekaman pada kalus dan menghambat pertumbuhan kalus (Sayed *et al.*, 2017; Wijaya *et al.*, 2020). Kitosan pada konsentrasi yang tinggi dan durasi elisitasi yang lama dapat menyebabkan aktivasi gen-gen yang terlibat dalam biosintesis flavonoid. Perubahan metabolisme dari primer yang berfokus pada pertumbuhan kalus menjadi metabolisme sekunder untuk menghasilkan metabolit sekunder sebagai upaya pertahanan sel terhadap cekaman tersebut mengakibatkan energi yang ada dalam sel tidak lagi digunakan untuk pertumbuhan melainkan untuk memproduksi metabolit sekunder (Isah *et al.*, 2018). Hal ini secara tidak langsung dapat menjadi penyebab penurunan biomassa kalus. Penghambatan terhadap pertumbuhan kalus terlihat paling besar ditunjukkan pada perlakuan K3W2 (konsentrasi kitosan 200 ppm durasi elisitasi 48 jam).

Akumulasi flavonoid kalus *T. paniculatum* dilakukan melalui pengukuran luas noda dan intensitas warna noda antara perlakuan dengan kontrol. Berdasarkan hasil pada (Gambar 4), luas noda sampel yang dihasilkan berkisar 0,06751 - 0,1178 cm². Perlakuan K2W2 menghasilkan luas noda paling besar dari perlakuan lainnya termasuk kontrol yaitu sebesar 0,1178 cm². Hal tersebut menunjukkan bahwa konsentrasi kitosan 150 ppm dengan durasi elisitasi 48 jam merupakan perlakuan yang dapat

meningkatkan akumulasi flavonoid dalam kalus *T. paniculatum*. Hasil ini sejalan dengan penelitian Jiao *et al.* (2018), yang membuktikan bahwa konsentrasi kitosan 150 ppm merupakan konsentrasi terbaik untuk meningkatkan kandungan flavonoid pada kultur kalus *Isatis tinctoria* L. Hal ini membuktikan bahwa pada konsentrasi dan durasi elisitasi kitosan yang optimal dapat mengaktifkan ekspresi serangkaian gen yang terlibat dalam sintesis enzim kunci untuk produksi flavonoid, yaitu PAL (*Phenylalanine Ammonia Lyase*). Aktivasi jalur transduksi sinyal oleh kitosan inilah yang selanjutnya meningkatkan biosintesis flavonoid dalam kalus (Khan *et al.*, 2019) Berdasarkan analisis kualitatif dan semi kuantitatif menunjukkan bahwa perlakuan K2W2 menyebabkan peningkatan kandungan flavonoid kalus *T. paniculatum* yang didukung dengan intensitas warna dengan skor 5 (kuning kehijauan gelap).

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa konsentrasi kitosan 150 ppm dan durasi elisitasi 48 jam berpengaruh terhadap peningkatan akumulasi flavonoid kalus *T. paniculatum* yang ditunjukkan melalui luas noda flavonoid (0,1178 cm²) dan intensitas warna skor 5 (kuning kehijauan gelap).

Daftar Pustaka

- Anwar, K & Triyasmono, L. (2016). Kandungan Total Fenolik, Total Flavonoid, dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.). *Jurnal Pharmascience*, 3(1), 83-92.
- Benjamin, E. D., Ishaku, G. A., Peingurta, F. A., & Afolabi, A. S. (2019). Callus Culture for the Production of Therapeutic Compounds. *American Journal of Plant Biology*, 4(4), 76. <https://doi.org/10.11648/j.ajpb.20190404.14>
- Guo, Z.G., Y. Liu., & M.Z., Gong. (2012). Regulation of Viblastine Biosynthesis in Cell Suspension Cultures of *Chatharantus roseus*. *Plant Cell Tissue Organ Cult*: Springer.
- Ikhtimami, A. (2012). Pengaruh Periode Subkultur terhadap Kadar Saponin Akar Rambut Tanaman Ginseng

- Tanaman Ginseng Jawa (*Talinum paniculatum* Gaertn.). Skripsi thesis, Universitas Airlangga.Surabaya
- Herman, K., N. (2019). Optimasi sterilisasi dan induksi kalus pada Ginseng Jawa (*Talinum paniculatum* Gaertn.). Yogyakarta: Skripsi Fakultas Bioteknologi Universitas Kristen Duta Wacana
- Indah, P.N. & Ermavitalini, D. (2013). Induksi Kalus Daun Nyamplung (*Calophyllum inophyllum* Linn.) pada Beberapa Kombinasi Konsentrasi 6- BAP dan 2,4-D. *Jurnal Sains dan Seni Pomits*; 2(1): 1-6.
- Isah, T., Umar, S., Mujib, A., Sharma, M. P., Rajasekharan, P. E., Zafar, N., & Fruk, A. (2018). Secondary metabolism of pharmaceuticals in the plant in vitro cultures: strategies, approaches, and limitations to achieving higher yield. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 132(2), 239–265. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1332-2>
- Jakubas, M. S & Nowak, B. H. (2022). Protective, Biostimulating, and Eliciting Effects of Chitosan and Its Derivatives on Crop Plants. *Molecules*, 27(2801), 1–17.
- Jiao, J., Qing Yan, G., Xin, W., Qi Ping, Q., Zi Ying, W., Jing, L., & Yu Jie, F. (2018). Chitosan Elicitation of *Isatis tinctoria* L. Hairy Root Cultures for Enhancing Flavonoid Productivity and Gene Expression and Related Antioxidant Activity. *Industrial Crops and Products*; 124(2018): 28-35.
- Karuppusamy, S. (2010). A Review on Trends in Production of Secondary Metabolites from Higher Plants by *In Vitro* Tissue, Organ, and Cell Cultures. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(13): 1222-1239.
- Khan, T., Khan, T., Hano, C., & Abbasi, B. H. (2019). Effects of chitosan and salicylic acid on the production of pharmacologically attractive secondary metabolites in callus cultures of *Fagonia indica*. *Industrial Crops and Products*, 129 (December 2018), 525–535. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.12.048>
- Lestario, L., Christian, A., & Martono, Y. (2009). Aktivitas Antioksidan Daun Ginseng Jawa (*Talinum paniculatum* Gaertn) Antioxidant Activity of Javanese Ginseng (*Talinum paniculatum* Gaertn) Leaves. *Agrotech: Jurnal Fakultas Teknologi Pertanian UGM*, 29(2): 71–78.
- Murashige, T & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Namdeo, A.G. (2007). Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: A review. *Pharmacognosy Reviews*, 1(1):69–79.
- Rahayu, B., Solichatun., & Anggarwulan, E. (2003). Pengaruh Asam 2,4-Diklorofenoksiasetat (2,4-D) terhadap Pembentukan dan Pertumbuhan Kalus serta Kandungan Flavonoid Kultur Kalus *Acalypha indica* L. *Biofarmasi*, 1(1): 1–6.
- Ramirez-Estrada, K., Vidal-Limon, H., Hidalgo, D., Moyano, E., Golenioski, M., Cusidó, R. M., & Palazon, J. (2016). Elicitation, an effective strategy for the biotechnological production of bioactive high-added value compounds in plant cell factories. *Molecules*, 21(2). <https://doi.org/10.3390/molecules21020182>
- Sayed, M., Khodary, S. E. A., Ahmed, E. S., Hammouda, O., Hassan, H. M., & El-Shafey, N. M. (2017). Elicitation of flavonoids by chitosan and salicylic acid in callus of *Rumex vesicarius* L. *Acta Horticulturae*, 1187(November), 165–176. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2017.1187.18>
- Seswita, D. (2010). Som Jawa (*Talinum paniculatum*) Ginseng Indonesia Penyembuh Berbagai Penyakit. *Warta Penelitian dan Pengembangan Tanaman*, 16(2): 21–23.
- Silalahi, M. (2022). *Talinum paniculatum* (Jacq.) Gaertn (Kajian Pemanfaatannya sebagai Bahan Pangan dan Bioaktivitasnya). *Jurnal Pro-Life*, 9(1): 289–299. <https://ejournal.uki.ac.id/index.php/prolife>
- Silalahi, M., (2010). Elisitasi Peningkatan Produksi Ajmalisin oleh Kalus *Catharantus roseus* (L.) G.Don. *Biologi*, P.

- P., Ilmu, F., Indonesia, U. K., Cawang, J. S., & Timur. *Berita Biologi*, 10(3): 305–311.
- Sitinjak, M.A., Isda M.N., & Fatonah, S. (2015). Induksi Kalus dari Eksplan Daun *In Vitro* Keladi Tikus (*Typhonium sp.*) dengan Perlakuan 2,4-D dan Kinetin. *Al-Kauniyah Jurnal Biologi*, 8(1): 32-39.
- Srisornkompon, P., R. Pichyangkura., & S. Chadchawan. (2014). Chitosan Increased Phenolic Compound Contents in Tea (*Camellia sinensis*) Leaves by Pre and Post Treatments. *Chitin and Chitosan Science*. 2, 1-6.
- Vanisree, M., Lee, C., Lo, S., Nalawade, S.M., Lin, C.Y., & Tsay, H. (2004). Studies on The Production of some Important Secondary Metabolites from Medicinal Plants by Plant Tissue Cultures. 45: 1-22.
- Wardani, D.P., Solichatun., & Setyawan, A.D. (2004). Pertumbuhan dan Produksi Saponin Kalus *Talinum paniculatum* Gaertn. pada Variasi Penambahan asam 2,4-D dan Kinetin. *Biofarmasi*; 2(1), 35-43
- Wijaya, R., Restiani, R., & Adityarini, D. (2020). Pengaruh Kitosan terhadap Produksi Saponin Kultur Kalus Daun Ginseng Jawa (*Talinum paniculatum* (Jacq .) Gaertn .). Prosiding Seminar Nasional Biologi Di Era Pandemi COVID-19, September, 252–261.
- Zuo, G., Guan, T., Chen, D., Li, C., Jiang, R., Luo, C., Hu, X., Wang, Y., & Wang, J. (2009). Total saponins of *Panax Ginseng* induces K562 cell differentiation by promoting internalization of the erythropoietin receptor. *American Journal of Chinese Medicine*, 37(4), 747–757. <https://doi.org/10.1142/S0192415X09007211>