

## Analisis Metabolit Sekunder Kultur Pucuk, Kalus, dan Tanaman Lapang *Chrysanthemum morifolium* Ramat

### Analysis of Secondary Metabolites of Shoot, Callus Culture and Field Plant of *Chrysanthemum morifolium* Ramat

Tia Setiawati<sup>1\*</sup>, Alma Ayalla<sup>1</sup>, Mohamad Nurzaman<sup>1</sup>, Valentina A.Kusumaningtyas<sup>2</sup>, Ichsan Bari<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departemen Biologi Fakultas MIPA Universitas Padjadjaran

<sup>2</sup>Departemen Kimia Fakultas MIPA Universitas Jenderal Ahmad Yani

<sup>3</sup>Departemen Agroteknologi Fakultas Pertanian Universitas Padjadjaran

\*E-mail: tia@unpad.ac.id

#### ABSTRACT

The chrysanthemum plant (*Chrysanthemum morifolium* Ramat) contains many secondary metabolites such as flavonoids and various volatile compounds that can be utilized as drugs. Tissue culture can be an alternative to enhance the production of certain secondary metabolite. The study aimed to determine the types of secondary metabolites that contained in shoot culture, callus and field plants of *C. morifolium*. The research method was exploration in the laboratory to analyze and compare the content of secondary metabolite from shoot culture, callus and field plants of *C. morifolium*. Callus was induced by explants of *C. morifolium* plantlet stems and leaves respectively on MS medium with an addition of 3 ppm 2,4-D + 2 ppm kinetin and 4 ppm 2,4-D. For shoot culture, single nodule explants with one leaf were planted on MS media with the addition of 1 ppm BAP. The secondary metabolite compounds were analyzed and identified by GC-MS (*Gas Chromatography-Mass Spectrometry*). The results showed that various types of secondary metabolites contained in shoot culture, callus and field plants of *C. morifolium*. In callus culture from leaf explants, four compounds from groups of alcohol, acetic acid and organosilicon were identified, whereas in callus culture from stem explants were identified eight compounds from aldehydes, esters, alkanes, and carboxylic acids group. In the shoot culture, nine compounds of alcohol, ketone, aldehyde, cycloalkane and organosilicon group were identified, while in the field plants five compounds were identified from the cycloalkanes, ketones, organoborones and organosilicon group. Some detected compounds have a potential as precursors of alkaloid, phenolic, and flavonoid.

**Keywords:** *chrysanthemum*, culture, shoots, callus, secondary metabolites.

#### PENDAHULUAN

Krisan (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) merupakan bunga potong yang termasuk ke dalam komoditas penting dalam bisnis tanaman hias. Krisan dapat juga dimanfaatkan sebagai bahan baku obat. Pada pengobatan tradisional China, krisan sering digunakan sebagai teh dan anti-inflamasi (Yang *et al.* 2017). Senyawa-senyawa seperti flavonoid, alkaloid, sekuiterpen laktone yang terkandung dalam *C. morifolium* memiliki aktivitas farmakologis diantaranya sebagai antibakteri, antifungal, dan antioksidan (Kim & Lee 2005). Xie *et al.* (2009) melaporkan pula bahwa bunga krisan dapat digunakan untuk pengobatan tradisional berbagai penyakit seperti demam, sakit kepala, batuk dan gangguan penglihatan. Beberapa kandungan senyawa alami dalam krisan seperti flavonoid, triterpenoid dan derivat *caffeoylquinic acid* telah diisolasi pada beberapa penelitian sebelumnya. Senyawa-

senyawa tersebut menunjukkan efek farmakologi yang sangat luas, diantaranya sebagai penghambat aktivitas enzim HIV-1 integrase dan aldose reduktase, serta sebagai antioksidan, antiradang, anti-mutagenik dan anti-aktivitas alergi. Selain itu, *Chrysanthemum* juga berpotensi sebagai kosmetik herbal, karena dapat menghambat aktivitas tyrosinase yang sering dikaitkan dengan aktivasi antioksidan, efek memutihkan dan melembabkan kulit (Yang *et al.* 2017).

Dilihat dari banyaknya manfaat krisan untuk kesehatan, maka dibutuhkan teknik perbanyakan yang cepat dan efektif untuk menghasilkan metabolit sekunder. Secara konvensional, metabolit sekunder sebagai bahan bioaktif dapat diperoleh dengan cara mengekstraksi langsung dari organ tanaman. Namun Fejér *et al.* (2018) menyatakan bahwa penggunaan tanaman secara intensif dapat mengurangi keragaman genetik. Selain itu,

dibutuhkan budidaya tanaman dalam skala besar, disamping proses ekstraksi, isolasi, dan pemurnian yang memerlukan biaya cukup besar (Ningsih 2014). Teknik kultur *in vitro* sering digunakan sebagai alternatif untuk memproduksi metabolit sekunder. Menurut Marchev *et al.* (2014) kultur *in vitro* dapat mengubah jalur sintesis metabolit sekunder dengan cara memperluas produksi fitokimia pada tanaman.

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa kultur pucuk terbukti mampu menghasilkan metabolit sekunder seperti menthofuran pada *Mentha piperita* L. (Fejér *et al.* 2018) dan asam rosmarinik pada *Salvia virgata* (Dowom *et al.* 2017). Demikian juga kultur kalus *Naringi crenulata* mampu menghasilkan 1,3,4,5-tetrahydroxy cyclohexane carboxylic acid (Singh *et al.* 2013).

Produksi metabolit sekunder dari kultur sel tanaman juga memiliki bermacam-macam keuntungan, termasuk manipulasi biosintesis senyawa bioaktif dalam kuantitas yang banyak dari kultur yang steril dan terkontrol (Docimo *et al.* 2015; Dias *et al.* 2016). Selain itu tingginya produktivitas metabolit sekunder secara *in vitro* tidak dipengaruhi musim panen dan potensi kontaminasi silang bila dibandingkan dengan tanaman yang tumbuh secara *in vivo* (Murch & Saxena 2006).

Beberapa penelitian membuktikan bahwa kandungan metabolit sekunder pada kultur *in vitro* mendekati atau lebih banyak dari tanaman yang ditumbuhkan secara *in vivo*. Nugroho *et al.* (2009) melaporkan bahwa hasil analisis profil kromatogram metabolit sekunder temulawak ditemukan 83% senyawa yang terkandung pada kalus temulawak sama dengan yang ditemukan pada tanaman induknya.

Demikian pula pada penelitian Kristina *et al.* (2007), pegagan (*Centella asiatica*) yang ditanam secara *in vitro* menghasilkan metabolit sekunder yang lebih bervariasi dibandingkan dengan pegagan lapang atau *in vivo*.

Penelitian ini bertujuan menganalisis jenis metabolit sekunder yang terkandung dalam kultur pucuk dan kalus krisan dan tanaman lapangnya (*in vivo*) sebagai pembandingan dengan menggunakan GC-MS (*Gas Chromatography-Mass Spectrometry*).

## METODE

### Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah agar pemat, alkohol 70% dan 95%, aquades, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, medium Murashige & Skoog

(Phyto Technology Laboratories), spirtus, sukrosa dan Zat Pengatur Tumbuh (3 ppm NAA, 1 ppm BAP, 4 ppm 2,4-D, 2 ppm kinetin). Bahan tanaman yang digunakan adalah planlet dan tanaman lapang krisan (*C.morifolium*) kultivar Yulimar dari Balai Pengembangan Benih Hortikultura dan Aneka Tanaman Pasir Banteng.

### Metode Penelitian

Penelitian dilakukan menggunakan metode eksplorasi di laboratorium untuk menganalisis jenis metabolit sekunder yang terkandung dalam kultur kalus, kultur pucuk dan sebagai pembandingan digunakan tanaman lapang krisan. Kalus diinduksi menggunakan eksplan batang dan daun planlet krisan pada media MS berturut-turut dengan penambahan 3 ppm 2,4-D + 2 ppm kinetin (Lestari 2018) dan 4 ppm 2,4-D (Purwaningsih *et al.* 2016). Kultur pucuk menggunakan eksplan nodus tunggal dengan satu daun yang ditanam pada media MS dengan penambahan BAP 1 ppm (Waseem *et al.* 2011). Pengamatan dilakukan pada 60 hari setelah tanam (HST) terhadap parameter tinggi planlet, jumlah daun, tekstur dan warna kalus dan ukuran kalus. Analisis metabolit sekunder dilakukan menggunakan GC-MS sedangkan analisis data dilakukan secara deskriptif. Bagian tanaman lapang yang digunakan untuk analisis metabolit sekunder adalah daun yang diperoleh dari tanaman krisan berusia 60 hari.

### Prosedur penelitian

#### Sterilisasi alat

Semua alat yang akan digunakan disterilisasi terlebih dahulu dalam autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 15 psi lb/inc<sup>2</sup> selama 15 menit. *Laminar air flow* sebelum digunakan untuk penanaman dibersihkan dahulu dengan kapas yang telah dibasahi alkohol 70% kemudian disinari dengan sinar UV selama 2 jam.

#### Pembuatan medium

Untuk membuat 1 L medium dilakukan dengan menimbang serbuk MS siap pakai sebanyak 4,43 g, lalu dimasukkan dalam beaker glass dan ditambahkan gula sebanyak 30 g dan agar (pemat) sebanyak 8g. Selanjutnya ditambahkan aquades hingga mencapai 1 L. Penambahan ZPT dilakukan sesuai dengan konsentrasi yang telah ditentukan untuk menginduksi kultur pucuk dan kalus krisan. Pengaturan pH media menggunakan pH meter dengan menambahkan NaCl 0,1 N atau NaOH 1 N hingga pH mencapai 5,8. Larutan media dimasak sampai mendidih lalu dimasukkan ke dalam botol kultur sekitar 15 mL/botol kemudian disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 17,5 psi selama 15 menit.

#### Penanaman eksplan

Penanaman eksplan dilakukan secara aseptik di dalam *laminar air flow cabinet*. Kultur pucuk diinduksi menggunakan eksplan nodus tunggal dengan 1 helai daun (tinggi ±1,5 cm) yang ditanam pada media MS + 1 ppm BAP. Kultur kalus

diinduksi dari eksplan batang dan eksplan daun. Batang planlet dipotong sepanjang 1 cm dan ditanam pada media MS + 3 ppm 2,4-D + 2 ppm kinetin, sedangkan eksplan daun dipotong dengan ukuran  $\pm 0,5 \text{ cm}^2$  dan ditanam pada media MS + 4 ppm 2,4-D. Masing-masing eksplan ditanam sebanyak 4 potong untuk setiap botolnya. Kultur diinkubasi pada temperatur 18-21°C dengan pencahayaan  $\pm 2000 \text{ lux}$  selama 60 hari.

#### Analisis metabolit sekunder

Preparasi ekstrak dilakukan dengan metode maserasi. Bahan kering tanaman dihaluskan kemudian ditimbang sebanyak 2 gram dan direndam dalam metanol selama 12 jam dengan sesekali diaduk. Ekstrak yang telah direndam kemudian disaring menggunakan kertas saring Whatmann No.41. Sebelum disaring, kertas saring dibasahi dengan metanol dan ditambahkan  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  sebanyak 0,2 gram pada kertas saring untuk menghilangkan endapan dan mengikat air pada filtrat.

Sistem GC-MS dioperasikan menggunakan kolom kapiler silika (30 x 0,25 mm ID x 1  $\mu$  Mdf). Gas Helium digunakan sebagai gas pembawa dengan laju 1 mL/menit, volume injeksi 0,5  $\mu$ L, temperatur injektor 250°C dan temperatur sumber ion 280°C. Temperatur oven diprogram pada 110°C, dengan laju kenaikan temperatur 10°C/menit sampai 200°C, kemudian 5°C/menit sampai 280°C, diakhiri dengan isothermal selama 9 menit pada temperatur 280°C (Sun *et al.* 2010).

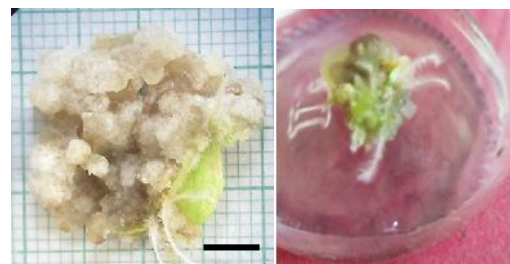
Hasil analisis GC-MS berupa kromatogram dengan sejumlah puncak yang menunjukkan jenis metabolit yang terkandung dalam sampel. dan kultur kalus krisan (*C. morifolium*). Interpretasi senyawa dilakukan berdasarkan waktu retensi setiap puncak yang muncul dalam kromatogram menggunakan pustaka standar Willey.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Pertumbuhan Kultur Kalus dan Kultur Pucuk *C. morifolium* Ramat Kultur Kalus

Eksplan daun *C. morifolium* diinduksi pada medium MS dengan penambahan 4 ppm 2,4-D (Purwianingsih *et al.* 2014). Pada 1 hari setelah tanam (HST), eksplan mulai mengalami elongasi dan pembengkakan. Pembengkakan pada eksplan dapat disebabkan adanya pengaruh auksin 2,4-D yang ditambahkan dalam media. Wahyuni *et al.* (2014) melaporkan bahwa eksplan daun *Aglaonema* sp. melengkung dan tulang daun membengkak disebabkan adanya pengaruh auksin dan tekanan turgor. Eksplan daun *C. morifolium* mulai membentuk kalus pada 11 HST yang ditandai adanya butir-butir kecil berwarna putih pada bagian perlukaan. Perlukaan pada eksplan memberikan beberapa sinyal termasuk sinyal *short-term* dan *long-term* luka dan sinyal

dari lingkungannya. Sinyal awal akan memengaruhi kemampuan eksplan untuk beregenerasi. Sinyal awal ini dikirim ke berbagai sel, seperti mesofil dan sistem vaskular untuk mengkonversi sel-sel yang rusak (Xu 2018) dengan bantuan zat pengatur tumbuh yang berfungsi dalam menutup luka (Utami *et al.* 2007).



Gambar 1. Morfologi kalus eksplan daun *C. Morifolium* (Ket: garis hitam menunjukkan ukuran skala 1 cm)

Kalus asal eksplan daun pada hari ke-60 memiliki rata-rata ukuran 13 berdasarkan skala *clay models* dengan warna kuning kecoklatan, bertekstur remah, dan sedikit berakar (Gambar 1). Penelitian Purwianingsih *et al.* (2016), melaporkan bahwa kalus krisan yang bertekstur remah dan kecoklatan mampu menghasilkan prekursor flavonoid quersetin, asam asetat, dan tetrahidroksikalkon. Hasil serupa ditemukan pada *Ricinus communis* (Abd Elaleem *et al.* 2015), citrus (Ramdan *et al.* 2014) yang menunjukkan bahwa kalus yang diinduksi menggunakan 2,4-D memiliki warna kecoklatan. Dalam induksi kalus, 2,4-D dalam media diperlukan untuk proliferasi sel sebagai auksin yang penting untuk *callogenesis*. Dalam hal ini 2,4-D bertindak sebagai sinyal auksin induktif untuk memicu aktivitas proliferasi eksplan (Ramdan *et al.* 2014).

Selain kalus, pada eksplan tumbuh juga akar, hal ini dapat disebabkan adanya peran auksin 2,4-D. Auksin berpengaruh terhadap pembentukan akar sebagai hasil interaksi dengan fitohormon lain yang mengendalikan perkembangan akar (Bellini *et al.* 2014; Pacurar *et al.* 2014). Selain auksin, Park *et al.* (2017) menyatakan bahwa sumber gula pada media juga merupakan faktor penting terhadap induksi akar. Sukrosa sering digunakan sebagai sumber karbon pada kultur jaringan sebagai penyedia energi untuk morfogenesis, termasuk akar (Yaseen *et al.* 2013). Sukrosa diketahui sebagai penginduksi stress osmotik untuk regulasi proses metabolik seperti sintesis asam

absisat, transportasi auksin, dan akumulasi karbohidrat pada sel dan jaringan tumbuhan yang akan meningkatkan atau menurunkan pertumbuhan dan perkembangan eksplan (Huang *et al.* 2012, Yaseen *et al.* 2013).

Kalus asal eksplan daun yang terbentuk pada penelitian ini berwarna kuning kecoklatan (Gambar 1). Serupa dengan hasil penelitian Anjusha & Gangaprasad (2017) yang menunjukkan bahwa *Gynochthodes umbellata* yang ditanam pada medium dengan penambahan 2,4-D menghasilkan kalus berwarna kekuningan dan bertekstur remah sebagai akibat adanya aktivitas 2,4-D yang menghambat pembentukan klorofil. Warna kecoklatan pada kalus dapat juga disebabkan adanya respon kalus terhadap lingkungannya atau kalus telah masuk pada fase stasioner. Perubahan kalus menjadi coklat menunjukkan pertumbuhan dan perkembangan kalus memasuki fase stasioner (penuaan) yang selanjutnya dapat menyebabkan kalus menjadi mati (Purnamaningsih & Ashrina, 2011).

Kalus asal eksplan batang *C. Morifolium* yang diinduksi pada MS dengan penambahan 3 ppm 2,4-D + 2 ppm kinetin menunjukkan elongasi dan pembengkakan eksplan pada pertama setelah penanaman. Eksplan batang mulai menghasilkan kalus pada 11 HST yang dimulai pada kedua ujung batang yang merupakan bagian perlukaan. Pembentukan kalus pada kombinasi ini menunjukkan efek sinergis dan/atau komplementer auksin dan sitokinin, yang lebih lanjut merangsang sensitivitas jaringan, khususnya sel-sel yang kompeten selama fase kalus (Ramdan *et al.* 2014).

Pada hari ke-60 kalus asal eksplan batang yang dihasilkan memiliki ukuran 8 skala *clay models*, berwarna hijau muda, bertekstur kompak, dan berakar. Tekstur kompak pada kalus dapat terjadi disebabkan adanya pengaruh pemberian hormon sitokinin kinetin ke dalam media. Hasil yang sama dilaporkan Castro *et al.* (2016) bahwa konsistensi kompak pada kalus *Byrsonima verbascifolia* dapat disebabkan terutama oleh sitokinin BAP dan kombinasi 2,4-D dengan BAP pada konsentrasi yang tinggi.

Penelitian Dwi (2012) menunjukkan bahwa kalus yang diinduksi dengan penambahan sitokinin memiliki tekstur kompak sebagai efek dari sitokinin dan auksin yang mempengaruhi potensial air dalam sel. Hal ini menyebabkan penyerapan air dari medium ke dalam sel

meningkat, sehingga sel menjadi lebih kaku.



Gambar 2. Morfologi kalus eksplan batang *C. morifolium* (Ket: garis hitam menunjukkan ukuran skala 1 cm)

Warna hijau pada kalus diduga karena adanya akumulasi klorofil pada kalus yang terbentuk. Klorofil disintesis dari asam glutamat melalui reaksi enzimatik yang kompleks dan beberapa tahap sintesisnya dipengaruhi cahaya (Ilag *et al.* 1994, Taiz & Zeiger, 2010). Selain cahaya, sitokinin dalam media juga sangat berpengaruh dalam perkembangan dan diferensiasi kloroplas. Sitokinin menstimulasi perubahan ultrastruktur yang khas untuk transisi etioplast ke kloroplas (Cortleven *et al.* 2016). Selain itu menurut Siddique & Islam (2015) di bawah cahaya putih, sel-sel kalus akan membentuk pigmen fotosintetik sehingga kalus dapat menghasilkan karbohidrat dan metabolit lain yang diperlukan sel untuk pertumbuhannya.

### Kultur Pucuk

Kultur pucuk diinduksi pada medium MS dengan penambahan 1 ppm BAP. Eksplan mulai tumbuh pada hari ke-6 setelah tanam dengan munculnya tunas baru dari nodus. Penambahan sitokinin dalam hal ini BAP dapat berperan dalam menginduksi pertumbuhan tunas.



Gambar 3. Morfologi kultur pucuk *C. morifolium* (Ket : garis hitam menunjukkan ukuran skala 1 cm)

Rata-rata tinggi planlet pada akhir pengamatan  $\pm 5$  cm. Ghanti *et al.* (2004) menunjukkan bahwa sitokinin, khususnya BAP dapat menangani dominansi apikal dengan

menumbuhkan tunas lateral dari dormansinya dan mendukung pembentukan pucuk dan elongasi. Kultur pucuk berwarna hijau dan beberapa daun mulai layu saat dipanen pada 60 HST. Hal ini dapat disebabkan kultur tumbuh pada media dengan waktu yang cukup lama, sehingga berkurangnya suplai nutrisi dari media ke dalam eksplan mengakibatkan eksplan mengalami kekeringan dan kelayuan. Minarsih *et al.* (2016) mengungkapkan bahwa kalus tebu yang disubkultur sampai subkultur ketiga, menunjukkan pertumbuhan kalus yang masih baik. Subkultur dilakukan untuk mempertahankan stok bahan tanaman (eksplan) agar planlet tetap tumbuh.

Selain BAP yang digunakan dalam penelitian ini untuk mendukung pertumbuhan kultur pucuk krisan, penambahan gula sebagai sumber karbon pada medium juga secara tidak langsung memengaruhi regenerasi tunas. Gula merupakan faktor utama dalam metabolisme yang diproduksi selama fotosintesis dan akan dimanfaatkan untuk pertumbuhan secara keseluruhan termasuk pertumbuhan tunas. Konsentrasi sukrosa pada medium mempengaruhi kemampuan fotosintesis dan perkembangan tunas pada konsentrasi tertentu, sukrosa juga dapat menjaga potensial osmotik pada dinding sel tunas, namun pada konsentrasi yang tinggi akan menghambat efisiensi fotosintesis dengan menurunkan kadar klorofil dan enzim untuk fotosintesis (Gago *et al.* 2014).

Kultur tunas pada penelitian ini diinkubasi dalam kondisi terang dengan pencahayaan  $\pm$  3500 lux. Intensitas cahaya, fotoperiod, dan kualitas spektral dapat mempengaruhi pertumbuhan, morfogenesis, dan produksi senyawa bioaktif pada kultur *in vitro*. Menurut Chung *et al.* (2010), cahaya menginduksi morfogenesis tumbuhan. Cahaya merupakan sinyal yang diterima oleh foto reseptor yang kemudian akan mengatur diferensiasi dan pertumbuhan tanaman (Muleo & Morini 2006).

Penelitian Bello-Bello *et al.* (2016) menunjukkan bahwa vanila yang ditanam secara *in vitro* dengan penyinaran lampu LED menghasilkan pertumbuhan yang baik karena meningkatkan proliferasi tunas vanila. Lampu *flourescent* dapat meningkatkan

*photosynthetic photon flux* (PPF) pada kultur *in vitro*. Semakin tinggi *photosynthetic photon flux* (PPF) yang dihasilkan, maka proses fotosintesis akan semakin tinggi dan mempengaruhi metabolisme dan pertumbuhan tanaman.

#### **Perbandingan Jenis Metabolit Sekunder Kultur Kalus, Tunas dan Tanaman Lapang *C. morifolium***

Metabolit sekunder yang terkandung pada kultur kalus, tunas dan tanaman lapang diidentifikasi menggunakan GC-MS (Tabel 1).

Tabel 1 menunjukkan senyawa-senyawa volatil yang teridentifikasi pada kalus daun, kalus batang, kultur pucuk, dan daun tanaman lapang. Jumlah senyawa volatil yang terdeteksi pada kultur kalus eksplan daun, kalus eksplan batang dan kultur pucuk berbeda berturut-turut sebanyak lima, delapan dan 10 senyawa, sedangkan pada tanaman lapangnya terdeteksi sebanyak 5 senyawa dari berbagai golongan.

Tabel 1 juga menunjukkan bahwa terdapat tiga senyawa yang sama ditemukan pada kultur yang berbeda, seperti dodekametilsikloheksasiloksan pada kultur pucuk, kultur kalus daun, dan tanaman lapang, 3-metoksi-1,2-propanadiol pada kultur pucuk dan kultur kalus daun, dan 2-propanon pada kultur pucuk dan tanaman lapang. Hasil ini menunjukkan bahwa kultur *in vitro* dapat menghasilkan senyawa yang sama atau lebih bervariasi dibandingkan dengan tanaman lapangnya. Penelitian Velayutham & Karthi (2015) menunjukkan bahwa tumbuhan *Hybanthus enneaspermus in vivo* menghasilkan jenis metabolit sekunder lebih sedikit dari kultur *in vitro* berdasarkan hasil analisis profil kromatogram menggunakan GC-MS.

Hasil ini menunjukkan bahwa kultur *in vitro* dapat dijadikan alternatif menggantikan penanaman tanaman secara tradisional, karena kultur *in vitro* produksi metabolit sekundernya terkontrol, dan ketersediaan tanaman pun akan terjaga (Rout, 2006). Kultur *in vitro* juga dapat menghasilkan fitokimia yang beragam dan dapat dikontrol, serta bebas akan gangguan perubahan iklim, kondisi tanah, dan bebas mikroorganisme dan serangga (Siahsar *et al.* 2011).

Tabel 1. Perbandingan jenis metabolit sekunder dalam kultur kalus daun, kalus batang, kultur pucuk dan tanaman lapang *C. morifolium*

No.	Nama Senyawa	DTL	KD	KB	KP	Golongan
1.	Siklobutana,1,2,2,3,3,4-heksadetero-1,4-bis (1,2,2-trideteroetil)					Sikloalkana
2.	2-Propanon					Keton (prekursor senyawa fenolik)
3.	Trimetil borat					Organoboron (prekursor alkaloid)
4.	Dimetilsiloksan pentamer					Organosilikon (prekursor alkaloid)
5.	Dodekametilsikloheksanil-oksian					Organosilikon (prekursor alkaloid)
6.	3-Metoksi-1,2-propanadiol					Alkohol (prekursor senyawa fenolik)
7.	1-Metoksi-2-propil ester asetat					Ester (prekursor senyawa fenolik)
8.	Tetradekametilsikloheptasil-oksian					Organosilikon (prekursor alkaloid)
9.	3-Metilbutanal					Aldehid (prekursor senyawa fenolik)
10.	Trans-2-Heptenal					Aldehid (prekursor senyawa fenolik)
11.	2,3-Dimetil-2-pentanol					Alkohol (prekursor senyawa fenolik)
12.	Iso amil salisilat					Ester (prekursor senyawa fenolik)
13.	Metil palmitat					Ester (prekursor senyawa fenolik)
14.	n-Dotriakontan					Alkana
15.	n-Dotriakontan					Alkana
16.	Asam pentadesilat					Asam karboksilat (prekursor senyawa glikosidik)
17.	2-Metilpentana					Alkana
18.	3-Metil-1-butanol					Alkohol (prekursor senyawa fenolik)
19.	2-Metilbutanal					Aldehid (prekursor senyawa fenolik)
20.	Metilsiklopentana					Sikloalkana
21.	Heksanaften					Sikloalkana
22.	Metilsikloheksana					Sikloalkana

Ket : DTL : daun tanaman lapang; KD : kalus eksplan daun; KB : kalus eksplan batang; KP: kultur pucuk

Pada Tabel 1 tampak bahwa terdapat perbedaan senyawa yang terdeteksi pada ketiga jenis kultur yang diuji. Ali & Tariq (2013) menunjukkan hasil penelitiannya bahwa sebagian besar metabolit sekunder dari jaringan bibit yang tumbuh di lapangan ditemukan di kultur kalusnya namun tidak ada kaitan dalam jumlah senyawa dan persentasenya. Selain itu terdapat perbedaan beberapa metabolit yang terkandung dalam eksplan dengan yang ditemukan pada kultur kalusnya.

Hasil analisis pada Tabel 1 menunjukkan bahwa sebagian besar senyawa yang terdeteksi adalah senyawa alkana. Alkana merupakan

senyawa organik hidrokarbon alifatik yang tidak memiliki gugus benzena (Chang, 2004). Pada kalus asal eksplan daun dan batang ditemukan senyawa golongan ester, aldehid, dan organosilikon. Senyawa-senyawa golongan ester dan aldehid ini berpotensi menjadi prekursor senyawa fenolik, sedangkan senyawa golongan organosilikon berpotensi menjadi prekursor senyawa golongan alkaloid jika bereaksi dan berikatan dengan senyawa yang mengandung unsur N atau senyawa-senyawa turunan asam amino. Saifudin (2014) menyatakan bahwa alkaloid mengandung unsur nitrogen pada kerangkanya. Alkaloid

diklasifikasikan berdasarkan asam amino prekursorinya dan di dalamnya masih memiliki atom nitrogen. Unsur-unsur pembentuk alkaloid adalah, karbon, nitrogen, dan oksigen (Sumardjo, 2009). Terdapat satu senyawa yang sama terdeteksi pada kalus daun, kultur pucuk dan tanaman lapang, yaitu dodekametilsikloheksasiloksan. Senyawa ini merupakan senyawa kompleks organosilikon yang diduga dapat menjadi prekursor pembentuk senyawa-senyawa turunan alkaloid.

Hasil pengukuran GC-MS pada penelitian ini mendeteksi adanya senyawa isoamil salisilat, senyawa keton, asam karboksilat, dan alkohol yang berpotensi membentuk senyawa flavonoid. Hasil GC-MS kalus batang terdeteksi adanya senyawa volatil isoamil salisilat, yang diduga merupakan prekursor senyawa flavonoid atau senyawa fenolik lain, karena memiliki struktur cincin benzena atau cincin aromatik (Pubchem 2018a). Flavonoid termasuk dalam golongan senyawa fenolik dengan struktur kimia C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>. Kerangka flavonoid terdiri atas satu cincin aromatik A, satu cincin aromatik B, dan cincin tengah berupa heterosiklik yang mengandung oksigen dan bentuk teroksidasi cincin ini dijadikan dasar pembagian flavonoid ke dalam sub-sub kelompoknya. Sistem penomoran digunakan untuk membedakan posisi karbon di sekitar molekulnya (Cook & Samman 1996).

Prekursor-prekursor ini pada tanaman akan mengalami reaksi kimia dengan bantuan berbagai enzim sehingga dapat membentuk senyawa metabolit sekunder yang dibutuhkan oleh tanaman tersebut untuk dapat melangsungkan kehidupan dan sebagai pertahanan diri terhadap berbagai tantangan dari lingkungan sekitarnya. Pembentukan metabolit sekunder secara biosintesis terjadi melalui jalur asam sikimat untuk golongan alkaloid dan fenolik, sedangkan golongan terpen melalui jalur asam mevalonat (Sumardjo 2009).

Senyawa yang ditemukan pada penelitian masih dalam bentuk senyawa dasar ataupun prekursor. Hal ini disebabkan senyawa-senyawa yang terdeteksi hanyalah senyawa volatil. Menurut Drozd (1985) untuk dapat mengetahui struktur metabolit sekunder lain perlu dilakukan derivatisasi terlebih dahulu untuk memisahkan molekul. Derivatisasi merupakan proses kimiawi untuk mengubah suatu senyawa menjadi senyawa lain yang mempunyai sifat-sifat yang sesuai untuk

dilakukan analisis menggunakan kromatografi gas yang dapat membantu zat-zat yang sulit menguap sehingga menjadi lebih mudah menguap.

Instrumen GC-MS dipasang parameter spektrofotometer massa termasuk ukuran massa sampai 500 m/z. Quersetin dan quersitrin yang sering ditemukan pada Krisan memiliki berat molekul secara berturut-turut 302.238 g/mol dan 448.38 g/mol (Pubchem 2018b; Pubchem 2018c), tidak terukur dengan GC-MS ini sehingga dapat diperkirakan bahwa kedua senyawa tersebut memiliki berat molekul yang lebih besar dari 500 m/z, sehingga kemungkinan senyawanya dalam bentuk quersetin dan quersitrin terglisosilasi atau dalam bentuk dimer atau polimernya.

### KESIMPULAN

Pada kultur pucuk *C. morifolium*. teridentifikasi sembilan senyawa dari golongan alkohol, keton, aldehyd, sikloalkana, dan organosilikon. Organosilikon berpotensi menjadi prekursor alkaloid. Pada kultur kalus asal eksplan daun *C. morifolium*. teridentifikasi empat dari golongan alkohol, asam asetat, dan organosilikon. Organosilikon berpotensi menjadi prekursor alkaloid sedangkan pada kalus asal eksplan batang terdeteksi delapan senyawa dari golongan aldehyd, ester, alkana, dan asam karboksilat. Ester berpotensi menjadi prekursor senyawa fenolik dan asam karboksilat berpotensi menjadi prekursor flavonoid. Pada tanaman lapang *C. morifolium* terdeteksi lima senyawa dari golongan sikloalkana, keton, organoboron, dan organosilikon. Keton berpotensi menjadi prekursor flavonoid, sedangkan organosilikon dan organoboron berpotensi menjadi prekursor alkaloid.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini terselenggara atas dana Hibah Internal Universitas Padjadjaran Skema Riset Fundamental Unpad dengan kontrak No. 2403/UN6.D/KS/2018. Ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya disampaikan kepada Rektor Universitas Padjadjaran.

### DAFTAR PUSTAKA

Abd Elaleem KG, Ahmed MM & Noor MKM. 2015. Effect of Explants and Plant Growth Regulators on Callus Induction in *Ricinus communis* L. *Res. J. Pharmaceutical Sci.* 4(1): 1-6.

- Ali S & Tariq A. 2013. Analysis of Secondary Metabolites in Callus Cultures of *Momordica charantia* cv. Jaunpuri. 59 (1): 23-32.
- Anjusha S& Gangaprasad A. 2017. Callus Culture And *In Vitro* Production of Anthraquinone in *Gynochthodes umbellata* (L.) Razafim. & B. Bremer (Rubiaceae). *Industrial Crops and Products*. 95:608-614
- Bellini C, Pacurar DI & Perrone I. 2014. Adventitious Roots And Lateral Roots: Similarities And Differences. *Annu. Rev. Plant Biol.* 65: 639–666.
- Bello-Bello JJ, Martínez-Estrada E, Caamal-Velázquez JH & Morales-Ramos V. 2016. Effect of LED Light Quality on *in vitro* Shoot Proliferation and Growth of Vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews). *Afr. J. Biotechnol.* 15(8) : 272-277.
- Castro AHF, de Queiroz Braga K, de Sousa FM, Coimbra MC & Chagas RCR. 2016. Callus Induction and Bioactive Phenolic Compounds Production from *Byrsonima verbascifolia* (L.) DC. (Malpighiaceae). *Revista Ciência Agronômica*. 47(1): 143-151.
- Chang, R. 2004. *Kimia Dasar: Konsep-konsep Inti*. Ed. ke-3. Jakarta: Penerbit Erlangga.
- Chung JP, Huang CY & Dai TE. 2010. Spectral Effects on Embryogenesis and Plantlet Growth of *Oncidium* ‘Gower Ramsey’. *Sci. Hortic.* 124, 511–516.
- Cook NC & Samman S .1996. Flavonoids-Chemistry, Metabolism, Cardioprotective Effects, and Dietary Sources. *Nutritio Biochem.* 7: 66- 76.
- Cortleven A, Marg I, Yamburenko MV, Schlicke H, Hill K, Grimm B, Schaller GE & Schmillung T. 2016. Cytokinin Regulates The Etioplast-chloroplast Transition Through The Two-Component Signaling System and Activation of Chloroplast-related Genes. *Plant Physiol.* 172(1): 464–478.
- Dias MI, Sousa MJ,RC Alves & Ferreira ICFR. 2016. Exploring Plant Tissue Culture to Improve The Production of Phenolic Compounds: A review. *Industrial Crops and Prod.* 82 : 9–22.
- Docimo T, Davis AJ, Luck K, Fellenberg C, Reichelt M, Phillips M, Gershenzon J & Auria JCD.2015. Influence of Medium and Elicitors on The Production of Cocaine, Amino Acids and Phytohormones by *Erythroxylum coca* calli. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 120(3):1061– 1075.
- Dowom SA, Abrishamchi P &Radjabian R. 2017. Enhanced Phenolic Acids Production in Regenerated Shoot Cultures of *Salvia virgata* Jacq. After Elicitation With Ag<sup>+</sup>ions, Methyl Jasmonateand Yeast Extract. *Industrial Crops and Products*. 103 : 81–88.
- Drozd J. 1985 Chemical Derivatization in Gas Chromatography. *J. Chrom Library*.19.
- Dwi NM, Waeniati, Muslimin & Suwastika IN. 2012. Pengaruh Penambahan Air Kelapa dan Berbagai Konsentrasi Hormon 2,4-D Pada Medium MS Dalam Menginduksi Kalus Tanaman Anggur Hijau (*Vitis vinifera* L.). *J. Natural Sci.* 1.(1) : 53-62.
- Fejér J, Gru ová D, Feo VD, Úrgeová E, Obert B & Pre ová A. 2018. Mentha×piperita L. Nodal Segments Cultures and Their Essential Oil Production. *Industrial Crops & Prod.* 112 : 550–555.
- Gago J, Martínez-Núñez L, Landín M, Flexas J & Gallego PP. 2014. Modeling The Effects of Light and Sucrose on *in vitro* Propagated Plants: A Multiscale System Analysis Using Artificial Intelligence Technology. *PLoS One.* 9(1): e85989.
- Ghanti K, Kaviraj CP, Venugopal RB, Jabeen FTZ & Srinath R. 2004. Rapid Regeneration of Mentha x piperita L. from Shoot Tip and Nodal Explants. *Indian J.Biotechnol.* 3: 594–598.
- Huang WL, Lee CH & Chen YR. 2012. Levels of Endogenous Abscisic Acid Andindole-3-acetic Acid Influence Shoot Organogenesis in Callus Cultures of Rice Subjected to Osmotic Stress. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 108 : 257–263.
- Ilag LL, Olson NH, Dokland T, Music CL, Cheng RH, Bowen Z, McKenna R, Rossmann MG, Baker TS & Incardona NL. 1994. DNA Packaging Intermediates of Bacteriophage fX174. *Structure.* 3: 353–363.
- Kim HJ & Lee YS. 2005. Identification of New Dicafeoylquinic Acids From *Chrysanthemum morifolium* and Their Antioxidant Activities. *J. Planta Med.* 71: 871–876.
- Kristina NN, Kusumah ED & Lailani PK. 2009. Analisis Fitokimia dan Penampilan Polapita Protein Tanaman Pegagan (*Centella asiatica*) Hasil Konservasi in



- vitro*. *Bul. Littro*. 20 (1) : 11 - 20.
- Lestari AW. 2018. Induksi Kalus Eksplan Batang Krisan (*Chrysanthemum morifolium* Ramat cv. Yulimar) dengan Kombinasi Konsentrasi Zat Pengatur Tumbuh Asam 2,4-diklorofenoksiasetat (2,4-D) dan Kinetin. *Laporan Kerja Praktik*. Program Studi Biologi. FMIPA. Unpad.
- Marchev A, Haas Ch Schulz S, Georgiev V, Steingroewer J, Bley T & Pavlov A. 2014. Sage *in vitro* Cultures: A Promising Tool For The Production of Bioactive Terpenes and Phenolic Substances. *Biotechnol. Lett*. 36: 211–221.
- Minarsih H, Suharyo, Riyadi I & Ratnadewi D. 2016. Pengaruh Jumlah Subkultur dan Media Sub-optimal Terhadap Pertumbuhan dan Kemampuan Regenerasi Kalus Tebu (*Saccharum officinarum* L.). *Menara Perkebunan*. 84(1): 28-40.
- Muleo R & Morini S. 2006. Light Quality Regulates Shoot Cluster Growth and Development of MM106 Apple Genotype in *in vitro* Culture. *Sci. Hortic*. 108(4): 364-370.
- Murch SJ & Saxena PK. 2006. A Melatonin-Rich Germplasm Line of St John's Wort (*Hypericum perforatum* L.). *J. Pineal Res*. 41(3): 284-287.
- Ningsih IY. 2014. Pengaruh Elisitor Biotik dan Abiotik Pada Produksi Flavonoid Melalui Kultur Jaringan Tanaman. *Pharmacy*. 11(02) : 117-132.
- Nugroho LH, Sumardi I, Wisnu M. & Anggraeny RN. 2007. Distribusi dan Profil Kromatogram Minyak Atsiri Pada Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) Yang Ditumbuhkan Secara *in vitro* dan *in vivo*. *Berkala Ilmiah Biologi*. 6(2): 87-95.
- Pacurar DI, Perrone I & Bellini C. 2014. Auxin is A Central Player in The Hormone Crosstalks That Control Adventitious Rooting. *Physiol. Plant*. 151 : 83–96.
- Park SH, Elhiti M, Wang H, Xu A, Brown D & Wang A. 2017. Adventitious Root Formation of *in vitro* Peach Shoots is Regulated by Auxin and Ethylene. *Sci Hort*. 226 :250–260.
- Pubchem. 2018a. *Quercetin*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/quercetin#section=Top> [23 Juli 2018].
- Pubchem. 2018b. *Quercitrin*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/quercitrin#section=Top> [23 Juli 2018].
- Pubchem. 2018c. *Isoamyl Salicylate*. [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Isoamyl\\_salicylate#section=Top](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Isoamyl_salicylate#section=Top) [23 Juli 2018].
- Purnamaningsih R & Ashrina M. 2011. Pengaruh BAP dan NAA Terhadap Induksi Kalus dan Kandungan Artemisinin dari *Artemisia annua* L. *J. Berita Biologi* .10(4).
- Purwianingsih W, Febri S & Kusdianti. 2016. Formation Flavonoid Secondary Metabolites in Callus Culture of *Chrysanthemum cinerariifolium* as Alternative Provision Medicine. *AIP Conference Proceedings*.1708, 030005. doi: 10.1063/1.4941150.
- Ramdan R, Handaji N, Beyahia H & Ibriz M. 2014. Influence of Growth Regulators on Callus Induction from Embryos of Five Citrus Root Stocks. *Journal of Applied Biosciences*. 73: 5959– 5965.
- Rout GR. 2006. Effect of Auxins on Adventitious Root Development From Single Node Cuttings of *Camellia sinensis* (L.) Kuntze and Associated Biochemical Changes. *Plant Growth Regul*. 48: 111– 117.
- Saifudin Azis. 2014. *Senyawa Alam Metabolit Sekunder: Teori, Konsep, dan Teknik Pemurnian*. Yogyakarta: Penerbit Deepublish.
- Siahsar B, Rahimi M, Tavassoli A & Raissi A. 2011. Application of Biotechnology in Production of Medicinal Plants. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci*.11 (3): 439-444.
- Siddique AB & Islam SMS. 2015. Effect of Light and Dark on Callus Induction and Regeneration in Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Bangladesh J. Bot*. 44(4): 643-651.
- Singh N, Meena MK & Patni V. 2013. Phytochemical Profiling and GC-MS Analysis of Bioactive Constituents of Callus of *Naringi Crenulata* (Roxb.) Nicolson. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res*. 24(1): 29-34.
- Sun QL, Hua S, Jian HY, Xin QZ & Yue RL. 2010. Flavonoids and Volatiles in *Chrysanthemum morifolium* Ramat Flower from Tongxiang County in China. *Afr.J. Biotech*. 9(25) : 3817-3821.
- Sumardjo D. 2009. *Pengantar Kimia*. Buku Panduan Kuliah Mahasiswa Kedokteran dan Program Strata 1 Fakultas Bioeksakta. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.

- Taiz L & Zeiger E. 2010. *Plant physiology*. 3rd Edition. Sinauer Associates Inc. Sunderland MA.
- Utami ESW, Sumardi I, Taryono & Semiarti E. 2007. Pengaruh - Naphtaleneacetic Acid (NAA) Terhadap Embriogenesis Somatik Anggrek Bulan *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl. *J. Biodiversitas*. 8(4) : 295- 299.
- Velayutham P & Karthi C. 2015. GC-MS Profile of In Vivo, In Vitro and Fungal Elicited In Vitro Leaves of *Hybanthus enneaspermus* (L.) F. Muell. *Int J. Pharm Pharm Sci*. 7(10) : 260-267.
- Wahyuni DK, Prasetyo D & Hariyanto S. 2014. Perkembangan Kultur Daun *Aglaonema* sp. Dengan Perlakuan Kombinasi Zat Pengatur Tumbuh NAA dan 2,4-D dengan BAP. *J. BIOSLOGOS*. 4 (1) : 10-16
- Waseem K, Jilani MS, Khan MS, Kiran M & Khan G. 2011. Efficient *in vitro* Regeneration of *Chrysanthemum morifolium* (L.) Plantlets From Nodal Segments. *Afr J. Biotech*. 10(8): 1477-1484.
- Xie YY, Yuan D, Yang JY, Wang LH & Wu CF. 2009. Cytotoxic Activity of Flavonoids From The Flowers of *Chrysanthemum morifolium* on Human Colon Cancer Colon 205 cells. *J. Asian Nat. Prod. Res*. 11(9): 771-778.
- Xu L. 2018. De novo Root Regeneration From Leaf Explants: Wounding, Auxin, and Cell Fate Transition. *Current Opinion in Plant Biology*. 41: 39-45.
- Yang L, Aobulikasimu N, Ping C, Jin HW, Hong L. 2017. Analysis of Floral Volatile Components and Antioxidant Activity of Different Varieties of *Chrysanthemum morifolium*. *Molecules Article*. 22: 1970.
- Yaseen M, Ahmad T, Sablok G, Standardi A & Hafiz IA. 2013. Review: Role of Carbon Sources For *in vitro* Plant Growth and Development. *Mol. Biol. Rep*. 40 : 2834-2849.