

13688-39347-1-SM_tia.doc

by

Submission date: 25-Apr-2020 11:47PM (UTC+0700)

Submission ID: 1307534275

File name: 13688-39347-1-SM_tia.doc (3.55M)

Word count: 5160

Character count: 31938

**PENGARUH *POLYETHYLENE GLYCOL* (PEG) TERHADAP KADAR
KUERSETIN KULTUR KALUS *Chrysanthemum morifolium* Ramat cv.
Yulimar PADA KONDISI PENCAHAYAAN BERBEDA**

**EFFECT OF *POLYETHYLENE GLYCOL* (PEG) ON QUERCETIN CONTENTS IN
(*Chrysanthemum morifolium* Ramat cv. Yulimar) CALLUS CULTURE
IN DIFFERENT LIGHTING CONDITIONS**

Tia Setiawati^{1*}, Syifa Fauzia Zazuli¹, Annisa¹, Mohamad Nurzaman¹ dan Budi Irawan¹

¹Program Studi Biologi Fakultas MIPA Universitas Padjadjaran
Jl. Raya Bandung-Sumedang Km.21 Jatinangor
*Email: tia@unpad.ac.id

Abstrak

Krisan (*C. morifolium* Ramat.) mengandung metabolit sekunder kuersetin dengan efek farmakologi yang sangat luas. Teknik elisitasi dengan penambahan *polyethylene glycol* (PEG) sebagai elisitor dapat dimanfaatkan untuk meningkatkan produksi metabolit sekunder secara *in vitro*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh PEG terhadap pertumbuhan kalus krisan dan kadar kuersetin 3-*O*-rhamnosida pada kondisi pencahayaan yang berbeda. Penelitian dilakukan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Eksplan berupa kalus berumur 45 hari setelah tanam (HST) disubkultur pada media MS + 4 ppm 2,4-D yang telah ditambahkan PEG 6000 dalam lima taraf konsentrasi yaitu 0 mg/L, 10 mg/L, 20 mg/L, 30 mg/L dan 40 mg/L. Kultur diinkubasi pada kondisi gelap dan terang. Parameter yang diamati adalah warna dan tekstur kalus, ukuran kalus, berat basah dan berat kering kalus serta kadar kuersetin 3-*O*-rhamnosida yang dianalisis menggunakan HPLC. Data kuantitatif dianalisis secara statistik menggunakan Analisis Varians (ANOVA) dan Uji Jarak Berganda Duncan dengan α 5%, sedangkan data kualitatif dianalisis secara deskriptif. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian PEG berpengaruh terhadap kadar kuersetin 3-*O*-rhamnosida kultur kalus krisan secara *in vitro* baik pada kondisi terang maupun gelap. Kadar kuersetin 3-*O*-rhamnosida tertinggi kalus krisan yang diinkubasi pada kondisi gelap dan terang terdapat pada perlakuan 1 ppm PEG berturut-turut sebesar 1,72 μ g/g BK dan 2,59 μ g/g BK.

Kata kunci: Cahaya; Kalus; Krisan; Kuersetin; PEG

Abstract

Chrysanthemum (*C. morifolium* Ramat.) contains quercetin secondary metabolites, which show very wide pharmacological effects. Elicitation technique with the addition of PEG as an elicitor can be used to increase the production of secondary metabolites *in vitro*. This study aimed to determine the effect of PEG on the growth of *Chrysanthemum* callus and quercetin 3-*O*-rhamnoside content in different lighting conditions. The experimental design used was a Completely Randomized Design (CRD). After 45 days, callus were subcultured on MS medium+ 4 ppm 2,4-D which PEG 6000 was added in five concentration levels (0 mg/L, 10 mg/L, 20 mg/L, 30 mg/L and 40 mg/L). Culture was incubated in dark and light conditions. Parameters observed were callus color and texture, callus size, wet weight and dry weight of callus, also quercetin 3-*O*-rhamnoside levels analyzed using HPLC. Quantitative data was statistically analyzed using Analysis of Variance (ANOVA) and Duncan's Multiple Distance Posthoc Test with α 5%. Qualitative data was analyzed descriptively. The results showed that the addition of PEG affected the content of quercetin 3-*O*-rhamnosida from *chrysanthemum* callus culture *in vitro*, both in light and dark conditions. The highest quercetin 3-*O*-rhamnosida content of *Chrysanthemum* callus which were incubated in dark and light conditions were found in 1 ppm PEG treatment of 1.72 μ g/g BK and 2.59 μ g/g BK.

Keywords: Callus; Chrysanthemum; Light; PEG, Quercetin

PENDAHULUAN

Chrysanthemum morifolium Ramat atau krisan lebih dikenal sebagai tanaman hias namun sebenarnya dapat dimanfaatkan sebagai tanaman obat. Tanaman krisan banyak dikembangkan di China dan Jepang sebagai bahan baku obat-obatan tradisional. Beberapa negara Eropa dan Amerika juga mulai mengembangkan tanaman krisan karena kandungan metabolit sekundernya yang berpotensi sebagai bahan obat. Pada *C. morifolium* Ramat, terdeteksi kadar flavonoid diantaranya luteolin-7-glucoside, quercetin-3-glucoside, quercitrin, myricetin, luteolin dan apigenin (Sun *et al.*, 2010). Quercitrin merupakan turunan kuersetin yang ditemukan dalam kadar paling tinggi mencapai 21,8% mg/g (Sun *et al.*, 2010). Penelitian Xie *et al.* (2009) menunjukkan bahwa metabolit sekunder yang terkandung dalam krisan memiliki fungsi untuk menghilangkan kelemahan otot pada jantung dan mengurangi efek ritme yang terlalu keras pada detak jantung. Kuersetin memiliki manfaat sebagai antioksidan, anti-³⁰er, antifungal, antiviral, anti-inflamasi, antibakteri, dan antidiabetes (Smith *et al.*, 2016) dan memberikan efek perlindungan terhadap ginjal dari kerusakan yang diakibatkan efek samping senyawa nefrotoksik seperti antibiotik golongan aminoglikosida, anti radang golongan *non-steroid anti-inflammation drug* (NSAID), dan obat kemoterapi (Gomes *et al.*, 2014).

Melihat besarnya potensi *C. morifolium* sebagai bahan baku obat, maka perlu dilakukan upaya untuk men¹hasilkan metabolit sekunder dengan cara yang lebih efektif, salah satunya melalui kultur jaringan. Metabolit sekunder diperoleh secara konvensional dengan cara mengekstraksi langsung dari organ tanaman, namun terkendala karena diperlukan budidaya tanaman dalam skala besar, di samping proses ekstraksi, isolasi, dan pemurniannya memerlukan biaya relatif mahal (Chattopadhyay *et al.*, 2002). Metode kultur jaringan memiliki kelebihan yaitu dapat dilakukan produksi senyawa alami secara kontinu dan dapat diandalkan (Vanisree *et al.*, 2004), dan meningkatkan produktivitas berlipat (Chattopadhyay *et al.*, 2002). Salah satu jenis kultur yang terbukti mampu mengakumulasi metabolit sekunder adalah kultur kalus (Rao *et al.*, 2015; Ali dan Asi, 2012; Janarthanam *et al.*, 2010).

Namun demikian produksi metabolit sekunder secara *in vitro* dilaporkan masih relatif rendah, oleh karena itu diperlukan metode yang dapat meningkatkan kadar metabolit sekunder, salah satunya dengan penambahan elisitor. Elisitor adalah senyawa yang mampu menginduksi pembentukan senyawa tertentu sebagai respon pertahanan tanaman akibat cekaman lingkungan (Angelova *et al.*, 2006). PEG merupakan senyawa dengan berat molekul tinggi, berperan sebagai agen osmotik yang dapat menimbulkan stres berupa cekaman kekeringan pada tanaman. Penambahan PEG mengakibatkan menurunnya potensial air pada media kultur, sehingga pertumbuhan eksplan terhambat dan meningkatkan kadar metabolit sekunder (Kacem *et al.*, 2017). Shehab *et al.* (2010) melaporkan adanya peningkatan kadar senyawa fenol pada kultur k¹us padi dalam kondisi cekaman akibat penambahan PEG. Pada penelitian lain disebutkan bahwa produksi metabolit sekunder steviol glikosida pada kultur kalus *Stevia rebaudiana* menunjukkan peningkatan setelah penambahan PEG 5% (Gupta *et al.*, 2015).

Akumulasi metabolit sekunder pada kultur jaringan tanaman dapat juga dipengaruhi oleh faktor lingkungan seperti cahaya. Cahaya memengaruhi pengaturan produksi bahan metabolit sekunder seperti antosianin, flavonol dan karotenoid (Ariany dkk., 2013). Kebutuhan cahaya untuk menghasilkan metabolit sekunder yang maksimal berbeda tergantung jenis tanaman. Kultur *Lithospermum erythrorhizon* yang tumbuh pada kondisi gelap menyebabkan produksi shikonin menjadi terhambat (Yazaki *et al.*, 1999) sedangkan pada *Thymus vulgaris* yang diberi perlakuan cahaya dapat meningkatkan kadar monoterpenoid (Sharafzadeh, 2012).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian PEG dalam berbagai konsentrasi terhadap kadar kuersetin kultur kalus krisan pada kondisi pencahayaan yang berbeda yaitu kondisi terang dan gelap.

MATERIAL DAN METODE

Bahan penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu planlet *C. morifolium* Ramat varietas Yulimar yang diperoleh dari Dinas Pertanian Tanaman Pangan Holtikultura dan Aneka Tanaman Pasir Banteng Sumedang-Jawa Barat, medium MS (Murashige-Skoog) (Phytotech), methanol p.a (Merck KGaA), PEG 6000 (Merck), standar kuersetin 3-*O*-rhamnosida (SIGMA), spiritus, sukrosa, zat pengatur tumbuh 2,4-D, agar bubuk, alkohol 70%, aquades.

Rancangan percobaan

Penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Eksplan berupa kalus berumur 45 hari disubkultur pada media perlakuan yaitu media MS + 4 ppm 2,4-D yang telah ditambahkan PEG 6000 dalam lima taraf konsentrasi yaitu 0 mg/L, 10 mg/L, 20 mg/L, 30 mg/L dan 40 mg/L. Kultur diinkubasi pada kondisi gelap dan terang. Masing-masing perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak 5 kali. Pengamatan dilakukan pada 45 hari setelah tanam (HST) terhadap parameter warna dan tekstur kalus, ukuran kalus, berat basah dan berat kering kalus serta kadar kuersetin 3-*O*-rhamnosida yang dianalisis menggunakan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Data hasil pengamatan dianalisis secara statistik menggunakan ANAVA dan bila terdapat perbedaan nyata maka dilakukan Uji Jarak Berganda Duncan pada taraf 5% sedangkan data warna dan tekstur kalus dianalisis secara deskriptif.

Prosedur penelitian

Pembuatan media perkuaran

Media perlakuan yang digunakan adalah media MS dengan penambahan ZPT 2,4-D 4 ppm dan PEG sebagai perlakuan dalam berbagai konsentrasi yaitu 0 mg/L, 10 mg/L, 20 mg/L, 30 mg/L, 40 mg/L. Kemasaman (pH) media diatur menggunakan pH meter hingga mencapai 5,8 dengan menambahkan NaOH atau HCl 1 N. Media dipanaskan hingga mendidih kemudian dituangkan ke dalam botol-botol kultur sebanyak sekitar 10-15 mL. Media selanjutnya disterilkan menggunakan autoklaf selama 60 menit dengan suhu 121°C dan tekanan 1,5 kg/cm².

Induksi kalus dan penanaman eksplan pada media perlakuan

Kalus diinduksi dari eksplan daun planlet krisan yang dipotong dengan ukuran kurang lebih 1 cm² dan ditanam pada media MS + 4 ppm 2,4-D (Purwaningsih dkk., 2016). Botol kultur berisi eksplan disimpan dalam ruang penyimpanan dengan suhu 26-28°C dengan intensitas cahaya 2500 lux selama 45 hari. Kultur kalus yang berumur 45 HST diinokulasikan sebanyak 1 gram ke dalam medium perlakuan yaitu medium MS + 4 ppm 2,4-D yang telah ditambahkan PEG dengan konsentrasi yang telah ditentukan sebagai perlakuan. Kalus diinkubasi pada dua kondisi pencahayaan yang berbeda yaitu gelap dan terang (2500 lux) selama 45 hari.

Pengamatan

Pengamatan dilakukan pada 45 HST terhadap parameter tekstur dan warna kalus, ukuran kalus, berat basah dan berat kering kalus, dan kadar kuersetin.

Penentuan Kadar Kuersetin

Ekstraksi, Preparasi Sampel dan Larutan Standar

Kalus dikeringkan, kemudian dihaluskan dan sebanyak 0,25 g diekstraksi dengan 10 mL larutan (metanol-asam asetat-akuades 100:2:100) selama satu jam menggunakan shaker pada suhu ruangan. Sebanyak 2 mL ekstrak disentrifugasi selama 10 menit pada 2000 rpm. Larutan kemudian disaring menggunakan membran filter selulosa dengan ukuran 0,22 µm. Filtrat digunakan untuk analisis HPLC (Moghaddasian *et al.*, 2012). Larutan stok standar kuersetin dilarutkan dalam methanol pada konsentrasi 200 ppm, 150 ppm, dan 100 ppm. Larutan standar disaring dengan membran filter berukuran 0,22 µm. Selanjutnya larutan standar dapat disuntikkan pada sistem HPLC secara langsung (Moghaddasian *et al.*, 2012).

Analisis HPLC

Analisis kromatografi dilakukan menggunakan kolom C18 (4.6 mm x 250 mm) sebagai fase diam dan metanol : asetonitril : akuades (10 : 10 : 75) yang mengandung 5% asam asetat sebagai fase gerak A dan methanol p.a sebagai fase gerak B. Detektor UV dengan panjang gelombang 368 nm, laju alir 1,0 mL/menit, dan volume injeksi 10 μ m. Puncak kromatografi dianalisis dengan membandingkan waktu retensi dan spektrum UV dengan standar referensi (Moghaddasian *et al.*, 2012) yang dimodifikasi.

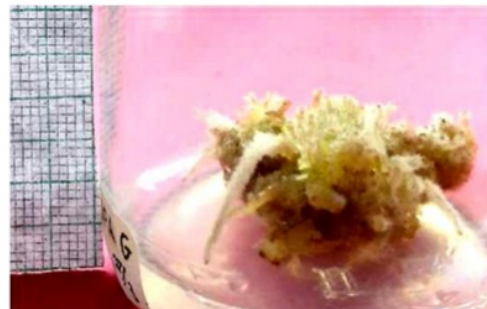
HASIL

Pengaruh Konsentrasi PEG terhadap Kualitas Kalus (Warna, Tekstur, Berat dan Ukuran) Krisan (*C. morifolium* Ramat cv. Yulimar) pada Kondisi Pencahayaan yang Berbeda

Pengamatan tekstur dan warna kalus dilakukan secara visual, sedangkan ukuran kalus dilakukan menggunakan skala *clay models*. Pada penelitian ini, kalus krisan yang ditumbuhkan pada media MS + 4 ppm 2,4-D dengan lima taraf konsentrasi PEG memberikan respon yang beragam, baik pada warna, tekstur maupun ukuran kalus seperti yang dapat dilihat pada **Gambar 1** dan **Tabel 1**.



0 ppm PEG (terang)



0 ppm PEG



1 ppm PEG (terang)



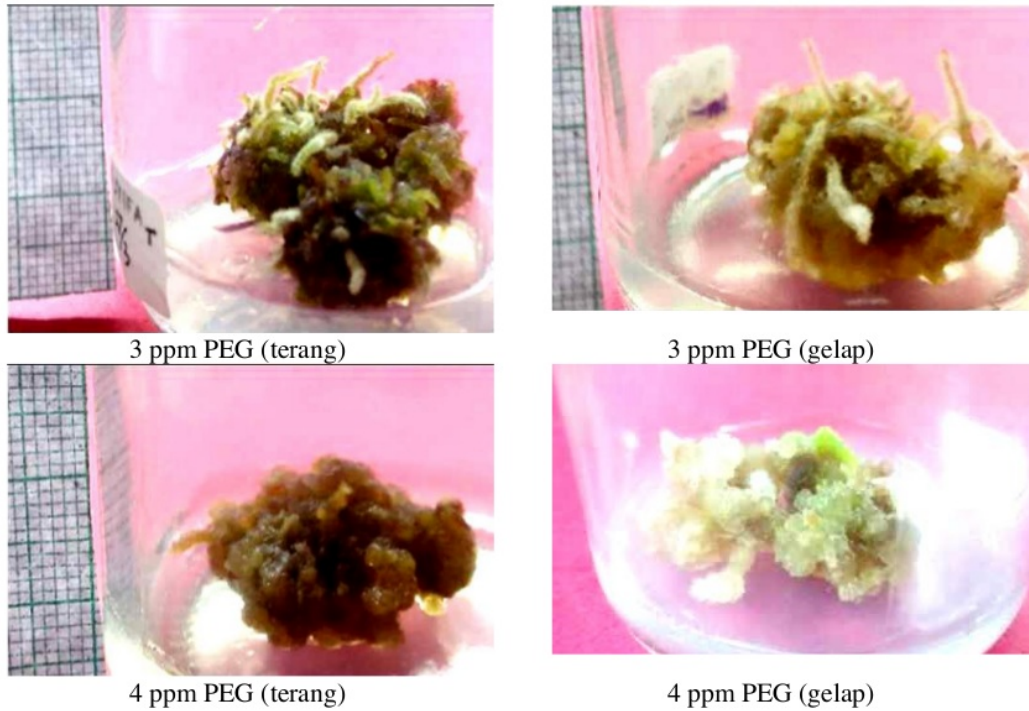
1 ppm PEG (gelap)



2 ppm PEG (terang)



2 ppm PEG (gelap)



Gambar 1. Struktur kalus krisan pada berbagai konsentrasi PEG, 45 Hari Setelah Tanam (HST)

Tabel 1. Tekstur, warna dan ukuran kalus pada berbagai konsentrasi PEG dan kondisi pencahayaan yang berbeda, 45 HST.

Konsentrasi PEG	Tekstur kalus		Warna kalus		Ukuran kalus (clays model)	
	Terang	Gelap	Terang	Gelap	Terang	Gelap
0 ppm	Remah	Remah	Coklat tua kehijauan	Putih kecoklatan	18	20
1 ppm	Remah	Remah	Coklat tua	Putih kecoklatan	19	20
2 ppm	Remah	Remah	Coklat tua kehijauan	Putih kecoklatan	17	18
3 ppm	Remah	Remah	Coklat tua kehijauan	Putih kecoklatan	16	18
4 ppm	Remah	Remah	Coklat tua kehijauan	Putih kecoklatan	16	7

Parameter berat basah dan berat kering dianalisis menggunakan ANAVA yang menunjukkan bahwa perlakuan konsentrasi PEG berpengaruh nyata terhadap kedua parameter tersebut baik pada kondisi gelap maupun terang. Untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan dilakukan uji Jarak Berganda Duncan yang hasilnya dapat dilihat pada **Tabel 2**.

Tabel 2. Rata-rata berat basah (gram) dan berat kering (gram) kalus pada 45 HST pada berbagai konsentrasi PEG dalam kondisi pencahayaan yang berbeda

Perlakuan PEG	Berat Basah (g)		Berat Kering (gram)	
	Terang	Gelap	Terang	Gelap
0 ppm	1,78 b	2,76 b	0,63 c	0,97 b
1 ppm	1,97 a	2,92 a	0,94 a	1,09 a
2 ppm	1,75 b	2,86 b	0,80 b	1,01 b
3 ppm	1,64 b	2,74 b	0,71 b	0,97 5
4 ppm	1,27 c	2,65 b	0,67 c	0,74 c

Keterangan: Nilai rata-rata yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata ($P < 0,05$).

Tabel 2 menunjukkan bahwa rata-rata berat basah dan berat kering kalus tertinggi baik yang diinkubasi pada kondisi terang dan maupun gelap terdapat pada perlakuan 1 ppm PEG yang berbeda nyata dengan perlakuan lainnya. Rata-rata berat basah tertinggi pada kondisi terang dan gelap berturut-turut sebesar 1,97 gram dan 2,92 gram, sedangkan rata-rata berat kering tertinggi berturut-turut sebesar 0,94 gram dan 1,09 gram.

Kadar Kuersetin 3-O-rhamnosida

Hasil ANAVA menunjukkan bahwa PEG berpengaruh nyata terhadap kadar kuersetin 3-O-rhamnosida dan hasil Uji Jarak Berganda Duncan untuk melihat perbedaan antar perlakuan dapat dilihat pada **Tabel 3**.

Tabel 3. Rata-rata kadar kuersetin 3-O-rhamnosida kultur kalus krisan (*C. morifolium* Ramat) pada berbagai konsentrasi PEG dan kondisi pencahayaan berbeda, 45 HST.

Perlakuan PEG	Kadar kuersetin 3-O-rhamnosida ($\mu\text{g/g BK}$)	
	Terang	Gelap
0 ppm	0,84 b	1,23 b
1 ppm	2,53 a	1,72 a
2 ppm	1,87 a	1,64 a
3 ppm	1,31 b	1,06 ⁵
4 ppm	1,11 b	0,95 b

Keterangan : Nilai rata-rata yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata ($P < 0,05$).

Tabel 3 menunjukkan bahwa penambahan PEG pada konsentrasi 1 ppm dan 2 ppm mampu meningkatkan secara signifikan kadar kuersetin 3-O-rhamnosida kultur kalus krisan pada kondisi terang dan gelap. Perlakuan 1 ppm PEG menghasilkan rata-rata kadar kuersetin 3-O-rhamnosida tertinggi baik pada kondisi terang maupun gelap, berturut-turut yaitu 2,59 $\mu\text{g/g BK}$ dan 1,72 $\mu\text{g/g BK}$ yang berbeda nyata dengan kontrol dan perlakuan PEG lainnya kecuali perlakuan 2 ppm PEG.

PEMBAHASAN

Pengaruh Konsentrasi PEG terhadap Kualitas Kalus (Warna, Tekstur, Berat dan Ukuran) Krisan (*C. morifolium* Ramat cv. Yulimar) pada Kondisi Pencahayaan yang Berbeda

Kalus krisan yang terbentuk dengan perlakuan beberapa konsentrasi PEG dan kondisi pencahayaan berbeda menunjukkan perbedaan warna yaitu putih kecokelatan, coklat tua, serta coklat tua kehijauan. Warna kalus menunjukkan perbedaan yang signifikan pada perlakuan pencahayaan yang berbeda. Kalus yang diinkubasi pada kondisi terang memiliki warna coklat dan coklat kehijauan, sedangkan pada kondisi gelap memiliki warna putih kecokelatan. Hal ini menunjukkan bahwa cahaya memengaruhi warna kalus. Menurut Hendaryono (1994) kondisi perubahan warna pada kalus dapat disebabkan adanya pigmentasi dan pengaruh cahaya. Kalus yang berwarna kecokelatan disebabkan oleh kadar fenol yang tinggi sedangkan warna kehijauan pada kalus disebabkan adanya kandungan klorofil dalam jaringan. Hal ini sesuai dengan penelitian Tavakkol *et al.* (2011), kalus Sawi (*Brassica napus* L). yang ditanam pada intensitas cahaya tinggi memiliki warna kecokelatan dan memiliki banyak kloroplas sehingga terdapat warna hijau pada kalus.

Pada kondisi gelap, kalus yang terbentuk berwarna putih kecokelatan, hal ini disebabkan tidak terbentuk atau rendahnya jumlah kloroplas yang terkandung pada sel kalus. Hasil yang sama pada penelitian Behbahani *et al.* (2011) menunjukkan kalus Butun (*Barringtonia racemosa*) yang ditanam pada kondisi gelap memiliki warna putih. Kalus yang diinkubasi pada kondisi gelap dengan konsentrasi PEG 0 ppm memiliki warna dominan putih, sedangkan pada perlakuan PEG 1 - 4 ppm warna kalus didominasi oleh warna kecokelatan (**Gambar 1**). Perubahan warna menjadi

kecokelatan tersebut disebabkan oleh metabolisme senyawa fenol. Menurut Tabiyeh *et al.* (2006) pencokelatan jaringan disebabkan oleh peningkatan produksi senyawa fenolik dan oksidasi selanjutnya oleh aktivitas enzim oksidase dan polimerisasinya. Penelitian Rao dan Jabeen (2013) menunjukkan bahwa semakin tinggi penambahan PEG pada media menyebabkan warna kalus Tebu (*Saccharum officinarum* L.) semakin coklat.

Perubahan warna kalus dapat juga disebabkan oleh ZPT yang ditambahkan pada media tumbuh. Penelitian ini menggunakan media MS dengan penambahan ZPT 4 ppm 2,4-D. Beberapa bagian kalus yang terbentuk dalam penelitian ini terdapat warna kehijauan yang dapat disebabkan oleh penambahan 2,4-D yang dapat memicu pembentukan klorofil pada kalus. Bagian yang berwarna putih pada kalus yang terbentuk dapat disebabkan oleh hilangnya polarisasi, dan apabila pada awalnya eksplan berwarna hijau sedangkan kalus yang terbentuk berwarna putih atau putih kecokelatan, berarti ada proses dekomposisi klorofil (Santoso dan Nursandi 2001).

Pada Tabel 1 terlihat bahwa kalus yang terbentuk pada semua perlakuan PEG (0 – 4 ppm) baik yang diinkubasi pada kondisi terang maupun gelap memiliki tekstur remah. Menurut Manuhara (2014), kalus remah merupakan kalus yang tersusun atas sel-sel yang panjang berbentuk tubular, struktur sel-selnya renggang, tidak teratur dan mudah rapuh. Kalus remah selain memiliki susunan sel yang renggang juga memiliki kadar air yang minim (Ariani *et al.*, 2016). Kalus remah yang diperoleh pada penelitian ini tampaknya dapat disebabkan penambahan PEG yang menginduksi kekeringan pada media kultur, sehingga kadar air dalam kalus sangat rendah. Penambahan PEG menyebabkan potensial air di dalam sel lebih tinggi daripada potensial air di media tumbuh, pergerakan air yang terjadi adalah dari sel menuju lingkungan (medium) sehingga menurunkan tekanan turgor pada dinding sel. Penurunan tekanan turgor pada dinding sel tersebut ditandai dengan kalus remah.

Penambahan PEG pada setiap konsentrasi tidak berpengaruh besar terhadap ukuran kalus, namun terdapat kecenderungan bahwa semakin tinggi konsentrasi PEG, ukuran kalus semakin mengecil. Pada perlakuan kontrol dan 1 ppm PEG menghasilkan ukuran kalus terbesar dengan ukuran 20 skala *clay models*. Ukuran kalus terkecil terdapat pada perlakuan 3 dan 4 ppm PEG dengan ukuran 16 skala *clay models*. Penurunan ukuran kalus tersebut dapat disebabkan oleh respon kalus terhadap stres lingkungan akibat penambahan PEG. Nadir *et al.* (2018) menunjukkan adanya penghambatan pertumbuhan kalus *Pennisetum purpureum* akibat stress yang disebabkan penambahan 2 ppm 2,4-D dan 4 ppm PEG pada media MS. Pertumbuhan erat kaitannya dengan penambahan ukuran, sehingga dengan terjadinya hambatan pertumbuhan kalus akibat pemberian PEG dapat menyebabkan penurunan ukuran kalus.

Berdasarkan hasil pengamatan, kondisi pencahayaan yang berbeda tidak memengaruhi tekstur kalus yang terbentuk. Kalus yang diinkubasi pada kondisi gelap dan terang memiliki tekstur yang sama yaitu remah. Hasil serupa diperoleh pada penelitian Moitreyee *et al.* (2013) yang menunjukkan bahwa kultur kalus *Aquilaria malaccensis* Lam. dengan penambahan ZPT 2,4-D pada media kultur menghasilkan kalus bertekstur remah, baik pada kondisi terang maupun gelap. Demikian pula dengan pengaruh pencahayaan terhadap ukuran kalus, menunjukkan tidak terlalu signifikan. Hal ini ditunjukkan dengan perbedaan ukuran kalus yang tidak begitu besar pada perlakuan gelap dan terang. Ukuran kalus terbesar terdapat pada perlakuan tanpa cahaya, yaitu 20 menurut skala *clay models*. Hasil yang sama ditunjukkan pada penelitian Kintzios *et al.* (2002) penanaman kalus *Lavandula vera* dengan perlakuan intensitas cahaya yang berbeda tidak memengaruhi ukuran kalus secara signifikan.

Berdasarkan Tabel 2, rata-rata berat basah dan berat kering kalus menurun sejalan dengan meningkatnya konsentrasi PEG. Hal ini menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi PEG yang ditambahkan menyebabkan semakin besar efek hambatan pertumbuhan kalus. Rahayu dkk. (2005) menyatakan bahwa PEG dapat menurunkan potensial osmotik melalui aktivitas matriks sub-unit etilena oksida yang mampu mengikat molekul air dengan ikatan hidrogen, dengan demikian ketersediaan air dalam media yang diperlukan jaringan menjadi berkurang. Peningkatan konsentrasi PEG mengakibatkan terhambatnya proses penyerapan air dan nutrisi yang disebabkan oleh penurunan potensial air pada media (tekanan turgor rendah), sehingga menurunkan

pembelahan sel dan laju pemanjangan sel (Guo *et al.*, 2013; Jaleel *et al.*, 2009) yang dapat berakibat pada penurunan berat kalus. Pada penelitian Gupta *et al.* (2014) penanaman kalus pada media dengan penambahan PEG dapat mengurangi berat basah kalus tanaman *Triticum aestivum* L.

Kadar Kuersetin 3-O-rhamnosida

Pada **Tabel 3** tampak bahwa pemberian PEG mampu meningkatkan kadar kuersetin kultur kalus krisan. Serupa dengan penelitian Al-Oubaidi dan Al-Sowaidi (2015) yang menunjukkan bahwa penambahan PEG 6000 pada kultur kalus *Olea europaea* L. terbukti meningkatkan kadar metabolit sekunder golongan fenol. Shreedhara (2013) menyatakan bahwa penambahan PEG dapat menyebabkan stres lingkungan pada kultur kalus *Millinonia hortensis* sehingga dapat meningkatkan produksi metabolit sekunder hispidulin. Stres merupakan salah satu faktor yang memengaruhi produksi metabolit sekunder pada tumbuhan. Pada penelitian ini PEG digunakan untuk menciptakan kondisi stres osmotik pada kultur kalus krisan untuk memengaruhi kadar metabolit sekunder yang terkandung di dalamnya. Tumbuhan memiliki mekanisme adaptasi pada lingkungan dengan stres osmotik yang diinduksi dengan PEG. Peningkatan stres osmotik akibat penambahan PEG ini dapat menstimulasi produksi metabolit sekunder seperti fenol, terpenoid, dan alkaloid (Selmar, 2008). Azhar *et al.* (2011) menyebutkan bahwa kadar metabolit sekunder golongan fenol pada *Trachyspermum ammi* L. meningkat secara signifikan akibat penambahan PEG. Stres osmotik pada kultur cabai (*Capsicum chinensis*) dapat meningkatkan produksi capsaicin (Kehie *et al.*, 2014) dan steviol glikosida pada kultur Stevia (*Stevia rebaudiana*) (Gupta *et al.*, 2015).

Berdasarkan **Tabel 3** diketahui bahwa terjadi peningkatan kadar kuersetin pada penambahan 1 ppm PEG, hal ini dapat disebabkan sel-sel kalus mengalami tahap resistensi atau masa adaptasi terhadap faktor cekaman PEG yang diberikan. Pada tahap adaptasi ini, sel akan berusaha mempertahankan diri dengan cara mensintesis metabolit sekunder (dalam hal ini kuersetin). Penambahan PEG melebihi 1 ppm menyebabkan penurunan kadar kuersetin pada kultur kalus krisan baik pada kondisi terang maupun gelap. Penurunan kadar kuersetin terjadi seiring dengan naiknya konsentrasi PEG. Hasil ini menunjukkan bahwa efektivitas elisitor dipengaruhi konsentrasi elisitor, sebagaimana diungkapkan Vanconseulo & Boland (2007) yang menyatakan bahwa elisitasi dipengaruhi oleh spesifikasi elisitor, jenis, konsentrasi, dan waktu aplikasi elisitor. Konsentrasi elisitor merupakan salah satu faktor yang menentukan kadar metabolit sekunder pada kultur jaringan yang dielisitasi. Membran plasma memiliki reseptor untuk elisitor dengan jumlah tertentu, sehingga untuk meningkatkan kadar metabolit sekunder diperlukan konsentrasi elisitor yang optimum.

Tabel 3 menunjukkan juga bahwa rata-rata kadar kuersetin 3-O-rhamnosida lebih tinggi pada kalus yang diinkubasi pada kondisi terang dibandingkan kondisi gelap. Hal ini menunjukkan bahwa cahaya memengaruhi produksi metabolit sekunder. Cahaya dapat menginduksi produksi nitrogen monoksida dan enzim *nitric oxide synthase* (NOS), sehingga memengaruhi aktivitas dari enzim *phenylalanin ammonia lyase* (PAL) yang berpengaruh pada sintesis flavonoid, seperti flavonoid pada kultur kalus *Ginkgo biloba* (Hao *et al.*, 2009). Ramani dan Jayabaskaran (2008) melaporkan bahwa terdapat peningkatan catharanthine dan vindoline pada kultur *Catharanthus roseus* pada perlakuan cahaya. Penelitian lainnya yang membuktikan bahwa cahaya meningkatkan produksi metabolit sekunder seperti gingerol and zingiberene pada kultur kalus *Zingiber officinale* (Anasori dan Asghari, 2008) dan alkaloid pada kalus *Hyoscyamus albus* (Sauerwein *et al.*, 1992). Namun, pada beberapa tanaman lebih efektif memproduksi metabolit sekundernya pada kondisi gelap, hal ini dapat disebabkan oleh sifat metabolit sekunder yang berbeda. Terdapat metabolit sekunder yang memiliki sensitivitas yang tinggi terhadap cahaya sehingga menyebabkan metabolit sekunder tersebut terdekomposisi. Menurut penelitian Kusbiantoro dan Purwaningrum (2018) metabolit sekunder curcumin akan mengalami dekomposisi jika terkena cahaya, menjadi beberapa produk degradasinya yaitu asam ferulat, aldehid ferulat, dehidroksinaftalen, vinilquairol, vanilin dan asam vanilat.

SIMPULAN

Pemberian berbagai konsentrasi PEG berpengaruh terhadap pertumbuhan dan kadar kuersetin 3-*O*-rhamnosida kultur kalus krisan (*C. morifolium* Ramat. cv Yulimar) secara *in vitro* yang diinkubasi dengan pencahayaan yang berbeda. Pada kondisi gelap, kalus memiliki warna coklat dan coklat kehijauan, sedangkan pada kondisi gelap memiliki warna putih kecokelatan. Perlakuan 1 ppm PEG menghasilkan berat basah dan berat kering kalus tertinggi baik pada kondisi terang dan maupun gelap berturut-turut sebesar 1,97 gram dan 2,92 gram, 0,94 gram dan 1,09 gram. Demikian pula, kadar kuersetin 3-*O*-rhamnosida tertinggi baik pada kondisi gelap maupun terang terdapat pada perlakuan 1 ppm PEG berturut-turut sebesar 1,72 $\mu\text{g/g}$ BK dan 2,59 $\mu\text{g/g}$ BK.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih disampaikan kepada Rektor Universitas Padjadjaran sehingga penelitian ini dapat terselenggara melalui dana Hibah Internal Unpad (HIU), Skema Riset Fundamental Unpad (RFU) tahun anggaran 2018 dengan Kontrak No. 2403/UN6.D/KS/2018.

REFERENSI

- Ahmad, N., Faisal, M., Anis, M. & Aref, J.M. (2010). *In vitro* callus induction and plant regeneration from leaf explants of *Ruta graveolens* L. *South African Journal of Botany*, 76, 597–600.
- Ali, H.T.S. & Asi, M.R (2012). Appraisal of an Important Flavonoid, Quercetin, in Callus Cultures of *Citrullus colocynthis*. *International Journal of Agriculture Biology*, 14, 528–532.
- Al-oubaidi, H.K.M. & Al-Sowaidi, W.M.M. (2015). Effect of poly ethylene glycol (PEG) on (Fenoles Compounds) production of *Olea europaea* L. from callus *in vitro*. *International Journal of Preclinical & Pharmaceutical Research*, 6(1), 16-19.
- Anasori P. & Asghari, G. (2008). Effects of light and differentiation on gingerol and zingiberene production in callus culture of *Zingiber officinale* Rosc. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 3(1), 59-63.
- Angelova, Z., Georgiev, S. & Roos, W. (2006). Elicitation of plants. *Biotechnology & Biotechnology Equipment*, 20, 2, 72-83.
- Aoki, S., Matsuka, M. & Hase, E. (1965). Degeneration of chloroplasts induced by different carbon sources, and effects of some antimetabolites upon the process induced by glucose. *Plant and Cell*, 6(3), 487–498.
- Ariani, R., Anggraito, Y.U. & Rahayu, E.S. (2016). Respon pembentukan kalus koro benguk (*Mucuna pruriens* L.) pada berbagai konsentrasi 2,4-D dan BAP. *Jurnal MIPA*, 39(1), 20-28.
- Ariany, S.P., Sahiri, N. & Abdul, S. (2013). Pengaruh kuantitas cahaya terhadap pertumbuhan dan kadar antosianin daun dewa (*Gynura pseudochina* (L.) DC) secara *in vitro*. *Agrotekbis*, 1(5), 413 – 420.
- Azhar, N., Hussain, B., Ashraf, M.Y. & Abbasi, K.Y. (2011). Water stress mediated changes in growth, physiology and secondary metabolites of Desi ajwain (*Trachyspermum ammi* L.). *Pakistan Journal of Botany*, 43, 15-19.
- Behbahani, M., Mehrnaz, S. & Mohamad, J.H. (2011). Optimization of callus and cell suspension cultures of *Barringtonia racemosa* (Lecythidaceae family) for lycopene production. *Science Agriculture*, 68(1), 69-76.
- Chattopadhyay, S., Sunita, F., Ashok, K.S. & Virendra, S. (2002). Bioprocess considerations for production of secondary metabolites by plant cell suspension cultures. *Biotechnology Bioprocess Engineering*, 7, 138-149.
- Gomes, I.B.S., Porto, M.L., Santos, M.C., Campagnaro, B.P., Pereira, T.M.C., Meyrelles, S.S. & Vasquez, E.C. (2014). Renoprotective, anti-oxidative and antiapoptotic effects of oral low-dose quercetin in the C57BL/6J model of diabetic nephropathy. *Lipids in Health and Disease*, 13, 184. doi: 10.1186/1476-511X-13-184.

- 17
Gupta, N., Bains, N.S. & Thind, S.K. (2014). *In vitro* callus approach in selection for drought tolerance in bread wheat and its relation to yield performance under field drought conditions. *Journal of Cell and Tissue Research*, 14(2), 4315-4321.
- 11
Gupta, P., Sharma, S. & Saxena, S. (2015). Biomass yield and steviol glycoside production in callus and suspension culture of *Stevia rebaudiana* treated with proline and polyethylene glycol. *Application Biochemistry Biotechnology*, 176(3), 863-874. doi: 10.1007/s12010-015-1616-0.
- 15
Guo, R., Hao, W.P., Gong, D.Z., Zhong, X.L. & Gu, F.X. (2013). Effects of water stress on germination and growth of wheat, photosynthetic efficiency and accumulation of metabolites. *InTechOpen*. <http://dx.doi.org/10.5772/51205>. Available online at <http://cdn.intechopen.com>.
- 10
Hao, G., Du, X., Zhao, F., Shi, R. & Wang, J. (2009). Role of nitric oxide in UV-B-induced activation of PAL and stimulation of flavonoid biosynthesis in *Ginkgo biloba* callus. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 97(2), 175–185.
- 3
Hendaryono, D.P.S. & Wijayani (1994) *Teknik Kultur Jaringan dan Petunjuk. Perbanyakan*
- 16
Tanaman Secara Vegetatif Modern. Yogyakarta : Kanisius.
- Jaleel, C.A., Manivannan, P., Wahid, A., Farooq, M., Somasundaram, R. & Panneerselvam, R. (2009). Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. *International Journal of Agriculture and Biology*. 11, 100–105
- Janarthanam, B., Gopalakrishnan, M. & Sekar, T. (2010). Secondary metabolite production in callus cultures of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Bangladesh Journal of Scientific Industrial Research*, 45(3), 243-248.
- 21
Kacem, N.S., Delporte, F., Muhovski, Y., Djekoun, A. & Wattillon, B. (2017). *In vitro* screening of durum wheat against water-stress mediated through polyethylene glycol. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(1), 239-247.
- 27
Kaur, A., Reddy, M.S. & Kumar, A. (2018). Direct somatic embryogenesis of potato [*Solanum tuberosum* (L.)] cultivar “Kufri Chipsona 2.” *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 134(3), 457–466.
- Kehie, M., Kumaria, S. & Tandon, P. (2014). Osmotic stress induced capsaicin production in suspension cultures of *Capsicum chinense* Jacq.cv. Naga King Chili. *Bioprocess Biosystem Engineering*, 37(6), 1055-1063. doi:10.1007/s00449-013-1076-2
- 14
Kintzios, S., Papanastasiou, I., Tourgelis, P., Papastellatos, C., Georgopoulos, V. & Drossopoulos, J. (2002). The effects of light on callus growth and somatic embryogenesis from *Lavandula vera* and *Teucrium chamaedrys*: A Preliminary Study. *Journal of Medicinal Plants*, 2, 223-227.
- Kusbiantoro, D. & Purwaningrum, Y. (2018) Pemanfaatan kadar metabolit sekunder pada tanaman kunyit dalam mendukung peningkatan pendapatan masyarakat. *Jurnal Kultivasi*, 17(1), 544-549.
- Lakhanpal, P. & Rai, D.K. (2007). Quercetin: A versatile flavonoid. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2(2), 22-37.
- Moghaddasian, B., Eradatmand, A.D. & Alaghemand, A. (2012). Simultaneous determination of rutin and quercetin in different parts of *Capparis spinosa*. *Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences*, 2(2), 35- 38.
- Moitreyee, S., Shrivastava, K. & Singh, S.S. (2013). Effect of culture media and growth hormones on callus induction in *Aquilaria malaccensis* Lam., a medicinally and commercially important tree species of North East India. *Asian Journal of Biological Sciences*, 6, 96-105.
- Nadir, M., Syahrir, R. & Syamsia. (2018). *In vitro* selection of a drought tolerant callus of dwarf napier grass (*Pennisetum purpureum* Cv. Mott). IOP Conf. Series: *Earth and Environmental Science*, 156. doi :10.1088/1755-1315/156/1/012024
- Purwaningsih, W., Febri, S. & Kusdianti. (2016). Formation flavonoid secondary metabolites in callus culture of *Chrysanthemum cinerariifolium* as alternative provision medicine. *AIP Conference Proceedings* 1708, 030005.

- 26 Ramani, S. & Jayabaskaran, C. (2008). Enhanced catharanthine and vindoline production in suspension cultures of *Catharanthus roseus* by ultraviolet-B light. *Journal of Molecular Signaling*, 3(9). doi:10.1186/1750-2187-3-9.
- 6 Rao, S. & Jabeen, F.T.Z. (2013). *In vitro* selection and characterization of polyethylene glycol (PEG) tolerant callus lines and regeneration of plantlets from the selected callus lines in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 19, 261–268. doi:10.1007/s12298-013-0162-x
- Rao, S., Usha, K. & Arjun. (2015). Production of secondary metabolites from callus cultures of *Centella asiatica* (L.) Urban. *Annals of Phytomedicine*, 4(1), 74-78.
- 1 Santoso, U. & Nursandi, F. (2003). *Kultur Jaringan Tanaman*. Malang : UMM Press.
- Sauerwein, M., Wink, M. & Shimomura, K. (1992). Influence of light and phytohormones on alkaloid production in transformed root cultures of *Hyoscyamus albus*. *Journal Plant and Physiology*, 140(2), 147–52.
- Selmar, D. (2008). Potential of salt and drought stress to increase pharmaceutical significant secondary compounds in plants. *Landbauforschung - vTI Agriculture and Forestry Research*, 58, 139–144.
- Sharafzadeh, S. (2012) Growth and secondary metabolites of basil, mint and thyme as affected by light. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 3(1), 43-46.
- 13 Shehab, G.G., Ahmed, O. & El-Beltagi, H.S. (2010). Effects of various chemical agents for alleviation of drought stress in rice plants (*Oryza sativa* L.). *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 38(1), 139-148. doi:10.15835/nbha3813627
- Shreedhara, C.S. (2013). Effect of elicitors on the production of hispidulin in the suspension culture of *Millingtonia hortensis*. *International Journal of Multidisciplinary Research and Development Res*, 1(12), 63-67.
- 12 Smith, A.J., Oertle, J., Warren, D. & Prato, D. (2016). Quercetin: a promising flavonoid with a dynamic ability to treat various diseases, infections, and cancers. *Journal of Cancer Therapy*, 7, 83-95. doi: 10.4236/jct.2016.72010
- Sukendah, Purnamaningsih, R. & Kuntjoro, Y. (2011). Micropropagation of rare kopyor dwarf coconut (*Cocos nucifera* L.) Through somatic embryogenesis: induction and morphological callus. *Journal of Nature Studies*, 10(1).
- 2 Sun, Q.L., Hua, S., Ye, J.H., Zheng, X.Q. & Liang, Y.R. (2010) Flavonoids and volatiles in *Chrysanthemum morifolium* Ramat flower from Tongxiang County in China. *African Journal of Biotechnology*, 9(25), 3817-3821.
- 24 Rahayu, E.S., Guhardja, E., Ilyas, S. & Sudarsono. (2005). Polietilena glikol (PEG) dalam media *in vitro* menyebabkan kondisi cekaman yang menghambat tunas kacang tanah (*Arachis hypogaea* L.). *Berkala Penelitian Hayati*, 11, 39–48.
- 20 Tabiyeh, D.T., Bernard, F. & Shacker, H. (2006). Investigation of glutathione, salicylic acid and GA3 effects on browning in *Pistacia vera* shoot tips culture. *Acta Horticulturae*. 726. doi : 10.1766/ActaHortic.2006.726.31
- Tavakkol, A., Angoshtari, R. & Kalantari, S. (2011). Effects of light and different plant growth regulators on induction of callus growth in rapeseed (*Brassica napus* L.) genotypes. *Plants Omics Journal*, 4(2), 60-67.
- Vasconsuelo, A. & Boland, R. 2007. Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. *Plant Science*, 172, 861–875.
- 7 Vanisree, M., Lee, C.Y., Lo, S.F., Nalawade, S.M., Lin, C.Y. & Tsay, H.S. (2004) Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 45, 1-22.
- 2 Xie, Y.Y., Yuan, D., Yang, J.Y., Wang, L.H. & Wu, C.F. (2009). Cytotoxic activity of flavonoids from the flowers of *Chrysanthemum morifolium* on human colon cancer colon 205 cells. *Journal of Asian Natural Products Research*, 11(9), 771-778.

Yazaki, K., Matsuoka, H., Ujihara, T. & Sato, F. (1999). Shikonin biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon*: light-induced negative regulation of secondary metabolism. *Plant Biotechnology*, 16(5), 335- 342.

ORIGINALITY REPORT

24%

SIMILARITY INDEX

24%

INTERNET SOURCES

15%

PUBLICATIONS

16%

STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1	etheses.uin-malang.ac.id Internet Source	2%
2	www.scribd.com Internet Source	2%
3	ejournal.uki.ac.id Internet Source	2%
4	journal.frontiersin.org Internet Source	1%
5	Submitted to Udayana University Student Paper	1%
6	m.scirp.org Internet Source	1%
7	chemistrycamp.ir Internet Source	1%
8	Submitted to University of Nottingham Student Paper	1%
9	ejournal.unsrat.ac.id Internet Source	1%

10	oar.icrisat.org Internet Source	1%
11	link.springer.com Internet Source	1%
12	www.scirp.org Internet Source	1%
13	ri.ufs.br Internet Source	1%
14	world-food.net Internet Source	1%
15	Submitted to University of Pretoria Student Paper	1%
16	ijmcr.com Internet Source	1%
17	tpcj.org Internet Source	1%
18	Menaka Thakur, Sujata Bhattacharya, Prem Kumar Khosla, Sunil Puri. "Improving production of plant secondary metabolites through biotic and abiotic elicitation", Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants, 2019 Publication	1%
19	krishikosh.egranth.ac.in Internet Source	1%

20	www.ishs.org Internet Source	1%
21	journals.uran.ua Internet Source	1%
22	www.doiserbia.nb.rs Internet Source	1%
23	journals.ut.ac.ir Internet Source	1%
24	Submitted to Universitas Pendidikan Indonesia Student Paper	1%
25	www.cibtech.org Internet Source	1%
26	jct.araku.ac.ir Internet Source	1%
27	publications.thapar.edu Internet Source	1%
28	repository.unair.ac.id Internet Source	1%
29	repository.usu.ac.id Internet Source	1%
30	scholar.unand.ac.id Internet Source	1%

Exclude quotes Off

Exclude bibliography On

Exclude matches < 1%