

Peningkatan Senyawa Flavonoid Melalui Penggunaan Elisitor Pada Kultur Kalus Tapak Dara (*Catharanthus roseus* L.)

Increasing Flavonoid Compounds Through The Use of Elicitors in Callus Culture *Catharanthus roseus* L.

Sudirman Numba¹, Netty Syam^{1*}, dan Mutiara Imaniar¹

¹Program Studi Agroteknologi Universitas Muslim Indonesia, Makassar

*E-mail: netty.said@umi.ac.id

ABSTRACT

Catharanthus roseus L., or periwinkle has attracted widespread attention because of its richness in bioactive compounds, especially flavonoids which are beneficial for health. Therefore, fast and effective propagation techniques are needed to obtain secondary metabolites in this plant. The aim of this study was to study the effect of Cu²⁺ Elicitor application on the morphology of *Catharanthus* callus and to determine the best concentration of Cu²⁺ Elicitor in increasing the flavonoid compound content in *Catharanthus*. Callus culture research was conducted at the Laboratory of Plant Reproductive Bioscience and Biotechnology, Teaching Industry Building, Department of the Faculty of Agriculture, Hasanuddin University, Makassar, while flavonoid compound analysis was conducted at the Laboratory of Pharmacognosy and Phytochemistry, Faculty of Pharmacy, Universitas Muslim Indonesia, Makassar. This study used a completely randomized design (CRD) with four levels of Cu²⁺ concentration, namely 0 ppm, 4 ppm, 6 ppm, and 8 ppm, each repeated three times. Each experimental unit consists of 3 culture bottles. Data were analyzed using analysis of variance and Tukey's test at the 5% level. The results of the study showed that the addition of Cu²⁺ elicitor at 4-8 ppm into the callus growth medium was not toxic to the callus, so the callus cells were still actively dividing as indicated by the callus being compact and greenish-yellow in color. The addition of Cu²⁺ elicitor with a concentration of 6 ppm was able to increase the flavonoid compound content in *Catharanthus roseus* callus culture. The use of Cu²⁺ elicitors has the potential to be developed in the production of secondary compounds in medicinal plants.

Keywords: *callus induction; Catharanthus roseus; CuSO₄; elicitor Cu²⁺; flavonoid*

Disubmit: 03 November 2023, **Diterima:** 15 Agustus 2024, **Disetujui:** 30 Oktober 2024;

PENDAHULUAN

Tanaman obat telah lama diakui sebagai sumber kaya senyawa-senyawa bioaktif yang berpotensi untuk pengobatan dan pengembangan produk farmasi (Rady *et al.*, 2021). *Catharanthus roseus* L., telah menarik perhatian luas karena kekayaan senyawa bioaktifnya, terutama flavonoid, alkaloid, dan berbagai senyawa lainnya yang memiliki aktivitas farmakologis yang signifikan (Verrananda, Fitriani, Febrina, 2016). Senyawa alami khususnya flavonoid yang terdapat dalam tapak dara bermanfaat sebagai antioksidan, anti-inflamasi, anti-mutagenik dan anti-karsinogen. Bahkan menurut Khoirunnisa dan Sumiwi, (2019), karena efek menguntungkannya pada kesehatan, flavonoid saat ini dikenal sebagai bahan penting dalam berbagai aplikasi *nutraceutical*, farmasi dan kosmetik.



Lisensi

Ciptaan disebarluaskan di bawah Lisensi Creative Commons Atribusi-BerbagiSerupa 4.0 Internasional.

Melihat banyaknya manfaat tapak dara bagi kesehatan, maka diperlukan teknologi pembiakan tanaman yang cepat dan efektif untuk mendapatkan metabolit sekunder sebagai bahan bioaktif yang diperlukan. Secara sederhana, metabolit sekunder bisa didapatkan melalui ekstraksi secara langsung dari berbagai bagian tanaman. Namun, pemakaian tanaman yang berkelanjutan untuk menghasilkan senyawa yang diinginkan, bisa berdampak pada ketersediaan tanaman tersebut (Ningsih, 2014). Teknik kultur jaringan dapat menjadi salah satu pilihan untuk mendapatkan metabolit sekunder tanpa menyebabkan kepunahan pada tanaman induk.

Pengembangan metode kultur jaringan tanaman, sebagai salah satu pendekatan terdepan dalam bioteknologi modern, telah memberikan platform yang menjanjikan untuk menghasilkan senyawa-senyawa bioaktif dalam jumlah yang signifikan dan konsisten. Kultur kalus merupakan satu diantara beberapa teknik kultur jaringan yang populer digunakan dalam menghasilkan senyawa bioaktif karena kemampuannya untuk menyediakan sistem yang terkontrol dan dapat diperbanyak untuk meningkatkan kandungan metabolit sekunder, termasuk flavonoid, dalam tanaman. Meskipun memiliki banyak keuntungan, produksi metabolit sekunder melalui kultur jaringan masih memiliki kekurangan yaitu produksinya masih cukup rendah pada beberapa kultur tumbuhan (Ariningsih *et al.*, 2003).

Silalahi (2010) menyatakan bahwa teknik yang banyak digunakan untuk meningkatkan produksi metabolit sekunder yakni *elisitasi*. Upaya meningkatkan kandungan senyawa flavonoid pada *Catharanthus roseus*, terdapat minat yang meningkat dalam penggunaan elisitor sebagai alat untuk merangsang produksi metabolit sekunder dalam kultur kalus. Penggunaan elisitor dalam kultur kalus *Catharanthus roseus* telah menarik perhatian para peneliti sebagai strategi yang menjanjikan untuk meningkatkan produksi flavonoid dan senyawa bioaktif lainnya (Verrananda, *et al.*, 2016; Muhammady, 2017).

Elisitor adalah senyawa kimia atau faktor lingkungan yang dapat merangsang respons pertahanan tanaman, termasuk sintesis senyawa-senyawa bioaktif, sebagai respons terhadap stres biotik atau abiotik (Khan *et al.*, 2021). Pemberian elisitor atau elisitasi bertujuan untuk menstimulir pembentukan fitoaleksin dan meningkatkan hasil senyawa sekunder yang terbentuk karena adanya kondisi stress. Elisitor, baik yang berasal dari senyawa kimia maupun faktor lingkungan, telah terbukti memicu respons pertahanan tanaman, mengarah pada peningkatan sintesis senyawa-senyawa bioaktif sebagai tanggapan terhadap stres biotik atau abiotik. Elisitor adalah agen aktif yang dapat merangsang pembentukan metabolit sekunder dengan cara menginduksi respons pertahanan pada tanaman (Retnaningati *et al.*, 2021). Penerapan elisitor dalam kultur kalus tidak hanya mempengaruhi produksi flavonoid, tetapi juga dapat meningkatkan kapasitas tanaman untuk menghasilkan senyawa-senyawa bioaktif lainnya.

Ion tembaga (Cu^{2+}) adalah elisitor yang dapat digunakan dalam peningkatan produksi senyawa sekunder. Penggunaan Cu^{2+} dalam kultur kalus dapat meningkatkan kadar *artemisinin* pada kalus *Artemisia vulgaris* (Jannah, 2016) maupun kadar *antrakuinon* dari kalus *Morinda citrifolia* (Ariningsih, Solichatun, Anggarwulan, 2003). Demikian pula dengan penelitian yang dilaksanakan Sutini *et al.* (2008) dengan pemberian elisitor Cu^{2+} dapat meningkatkan senyawa flavan-3-ol sebesar 12,5% dibandingkan tanpa pemberian elisitor Cu^{2+} melalui kultur kalus *Camellia sinensis* L. Namun, masih perlu perhatian dalam penambahan elisitor adalah jenis dan konsentrasi elisitor yang harus tepat untuk meningkatkan senyawa sekunder yang diinginkan. Penggunaan elisitor Cu^{2+} untuk produksi senyawa flavonoid melalui kultur kalus tapak dara masih jarang publikasikan. Karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan konsentrasi elisitor Cu^{2+} yang dapat meningkatkan kadar senyawa flavonoid dalam kultur kalus tapak dara. Penelitian tentang penggunaan elisitor dalam kultur kalus *Catharanthus roseus* tidak hanya bertujuan untuk meningkatkan kandungan flavonoid saja, tetapi juga untuk memahami mekanisme respons tanaman terhadap elisitor. Melalui pemahaman yang lebih mendalam terkait mekanisme ini, diharapkan akan dapat dikembangkan strategi yang lebih efektif dan efisien untuk memacu produksi flavonoid pada tanaman ini.

METODE PENELITIAN

Penelitian kultur jaringan dikerjakan di Laboratorium Bio-Sains dan Bioteknologi Reproduksi Tanaman, Gedung Teaching Industry, Departemen Budidaya Pertanian di Fakultas Pertanian, Universitas Hasanuddin, Makassar. Pengujian kandungan Flavonoid dilakukan di Laboratorium Farmakognosi-Fitokimia, Fakultas Farmasi, Universitas Muslim Indonesia, Makassar.

Alat dan Metode. Peralatan yang digunakan dalam reset ini berupa timbangan analitik, Erlenmeyer 1 ukuran 1 liter, milipore filter, botol kultur, autoklaf, gelas ukur, spatula, kompor gas, pH meter, pinset, cawan petridish, scalpel, rak kultur, mortar, hot plate, *magnetic stirrer*, oven, sprayer, bunsen, korek api, *colour chart*, pipet tetes, corong, vial, dan pipet mikro dan spektrofotometer UV-Vis Genesys. Bahan yang digunakan yaitu daun tapak dara bunga pink (daun ke-3 dan ke-4 dari pucuk) dengan ciri warna hijau dan sehat, media Murashige & Skoog (MS), agar-agar, ZPT (2,4-D, kinetin), gula pasir, HCl, NaOH, CuSO₄, AlCl₃, kuersetin standar, bycline, CH₃COOK, tween 20, aquades steril, spiritus, alkohol 70% dan 96%.

Rancangan Percobaan. Penelitian dilakukan dalam tiga tahap utama yaitu Induksi kalus daun tapak dara, Elisitasi dan Ekstraksi kalus. Desain percobaan berupa Rancangan acak lengkap (RAL) yang beri penambahan ion CuSO₄ pada media MS. Perlakuan penambahan ion CuSO₄ terdiri dari 4 (empat) level konsentrasi yaitu: 0 ppm, 4 ppm, 6 ppm, dan 8 ppm, menggunakan 3 kali ulangan dan setiap unit pengamatan terdapat 3 (tiga) botol kultur. Elisitasi dilakukan pada kalus yang telah disubkultur sebanyak 3 kali (Silalahi, 2010). Elisitasi dilakukan dengan menanam kalus ke media perlakuan yang mengandung elisitor Cu²⁺ (CuSO₄) dengan konsentrasi sesuai perlakuan, dan diinkubasi pada suhu 18°C - 27°C, selama 10 hari (Setiawati *et al.*, 2021).

Pengamatan warna kalus menggunakan *colour chart*, tekstur kalus, bobot segar dan bobot kering kalus diamati pada akhir penelitian. Analisis Sidik ragam (ANOVA) untuk mengidentifikasi pengaruh perlakuan, dan jika terdapat perbedaan yang signifikan, akan dilanjutkan dengan Uji BNJ untuk mengetahui perlakuan yang berbeda.

Prosedur Penelitian. Eksplan daun tapak dara disterilisasi menggunakan larutan detergen, alkohol 70%, bayclin 20% + tween 20 (2 tetes dan direndam selama 10 menit) dan bycline 15% selama 7 menit, lalu dibilas aquades steril masing-masing 3 kali. Sterilisasi eksplan ini dimodifikasi dari Shofiyani dan Hajoeningtjas (2010) dan dikerjakan di dalam *laminar air flow*. Peralatan diseksi pinset, gunting, scalpel, peralatan gelas (*glass ware*), dibersihkan menggunakan deterjen, dibilas dengan menggunakan air mengalir dan disterilisasi menggunakan autoklaf (tekanan 17,5 psi, pada suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 60 menit).

Media induksi kalus dibuat berupa media MS (Murashige & Skoog) dengan penambahan ZPT 2,4-D sebanyak 2 ppm, kinetin 0,2 ppm (Lombonbitung *et al.*, 2015), gula pasir sebanyak 30 g per L dan diatur pHnya pada kisaran range pH 5,6-5,8 dan ditambahkan 7 g/L agar-agar. Media MS dipanaskan di atas kompor sampai mendidih dan didistribusi pada masing-masing sebanyak 20 ml per botol. Mulut botol ditutup dengan plastik dan diberi karet pengikat, selanjutnya disterilkan pada autoklaf (suhu 121°C, pada tekanan satu ATM selama 15 menit).

Penanaman Eksplan. Kultur diinduksi kalus dari eksplan daun (ukuran 1×1 cm) pada botol kultur berisi media MS dan setiap botol berisi 3 potong daun, lalu ditempatkan pada ruang inkubator. Subkultur dilakukan setelah kalus berumur 4 minggu setelah inisiasi dan subkultur berikutnya dilakukan 2 kali setiap 3 minggu pada media yang sama. Selanjutnya, kalus disubkultur ke media perlakuan (Pandiangnan dan Nainggolan, 2006), pada suhu 18°C-27°C, cahaya 1.100 lux.

Uji Total Kandungan Flavonoid. Kalus kering ditimbang 0,05 g lalu diekstraksi dengan 5 ml etanol 95 persen dan dikocok dengan kecepatan 200 rpm selama 24 jam. Hasil ekstraksi kalus disaring, dan filtratnya dicukupkan menjadi 25 ml dengan etanol 80 persen lalu diinkubasi selama 30 menit. Kurva kalibrasi disusun menggunakan larutan standar kuersetin pada konsentrasi 20, 40, 60, 80, dan 100 g per mL. Larutan standar kuersetin yang encer yaitu 0,5 ml diambil lalu dicampur secara terpisah dengan 1,5 ml etanol

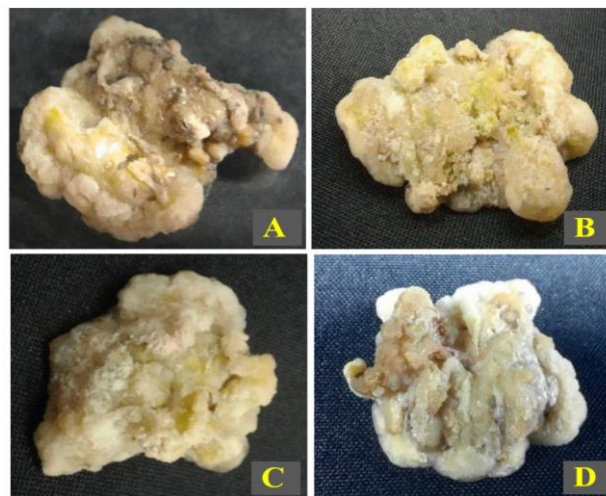
95 persen, 0,1 ml AlCl₃ 10 persen, 0,1 ml CH₃ COOK 1M dan 2,8 ml air suling. Nilai penyerapan total flavonoid diukur pada panjang gelombang 415 nm. Sampel kosong disiapkan dengan memipet 0,5 ml etanol 95persen, 2,8 ml AlCl₃ 10 persen dan CH₃COOK 1M Penetapan total senyawa flavonoid dalam kalus tapak dara dianalisis menggunakan spektrovotometer UV-Vis dan dihitung berdasarkan rumus penetapan kadar flavonoid total (Chang *et al.*, 2002) sebagai berikut:

$$\text{Total Flavonoid} = \frac{V \times \text{Konsentrasi Awal} \times \text{FP}}{\text{Bobot sampel}}$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pertumbuhan Kalus. Kalus adalah kumpulan sel yang amorphous, belum terorganisasi dan belum mengalami diferensiasi (Retnaningati *et al.*, 2021). Induksi kalus untuk produksi metabolit sekunder dilakukan dengan pemberian senyawa Elisitor Cu²⁺. Kultur kalus untuk mendapatkan hasil metabolit sekunder memiliki keunggulan yaitu kadar metabolit sekunder yang dihasilkan lebih banyak dibandingkan dengan tanaman itu sendiri (Sulichantini, 2015). Pengamatan warna dan tekstur kalus tapak dara pada berbagai konsentrasi elisitor Cu²⁺ ditampilkan pada Gambar 1 dan Tabel 1.

Kalus yang terbentuk sebelum pemberian elisitor Cu²⁺ semuanya berwarna kuning pucat (*pale yellow*) dan setelah 10 hari sejak pemberian elisitor, sebagian kalus berubah warna menjadi kuning pucat kehijauan (*pale greenish yellow*). Perubahan warna menjadi kuning pucat kehijauan terutama terjadi pada pemberian elisitor Cu²⁺ konsentrasi 8 ppm (Gambar 1). Warna kuning pada kalus disebabkan karena kalus secara berkelanjutan dan berulang mengalami pembelahan sel sehingga mengakibatkan absennya kloroplas (Heryanto, Soegihardjo dan Purwijantiningsih, 2014; (Retnaningati *et al.*, 2021).



Gambar 1. Warna dan tekstur kalus hasil induksi berbagai konsentrasi Cu²⁺ pada media. Kontrol= tanpa Cu²⁺ (A), Cu²⁺ 4 ppm (B), Cu²⁺ 6 ppm (C) dan Cu²⁺ 8 ppm (D).

Tabel 1. Warna kalus sebelum dan sesudah aplikasi berbagai konsentrasi Elisitor Cu²⁺

Konsentrasi CuSO ₄ (ppm)	Sebelum Perlakuan	Setelah Perlakuan
C0 (0)	Pale Yellow	Pale Yellow
	Pale Yellow	Pale Yellow
	Pale Yellow	Pale Yellow
C1 (4)	Pale Yellow	Pale Yellow
	Pale Yellow	Pale Yellow

	Pale Yellow	Pale Greenish Yellow
C2 (6)	Pale Yellow	Pale Yellow
	Pale Yellow	Pale Yellow
	Pale Yellow	Pale Greenish Yellow
C3 (8)	Pale Yellow	Pale Greenish Yellow
	Pale Yellow	Pale Greenish Yellow
	Pale Yellow	Pale Yellow

Keterangan:
 Pale Yellow = Kuning Pucat
 Pale Greenish Yellow = Kuning Pucat Kehijauan

Warna kehijauan pada kalus menunjukkan adanya kandungan klorofil dan telah terjadi proses fotosintesis pada kalus. Hal ini juga terkait dengan peran Cu^{2+} yang ditambahkan ke dalam media pertumbuhan kalus sebagai komponen plastosianin yang termasuk bagian penting untuk sistem transpor elektron pada fotosintesis sehingga proses fotosintesis meningkat (Jannah, 2016). Warna kalus yang terbentuk tersebut dapat diketahui bahwa penambahan elisitor Cu^{2+} 4 ppm, 6 ppm dan 8 ppm pada media pertumbuhan kalus tidak bersifat toksik sehingga sel-selnya masih aktif membelah.

Tekstur kalus yang diberikan ion Cu^{2+} sebagai elisitor pada media pertumbuhan kalus memperlihatkan hasil pada Gambar 1 yang tidak berbeda tanpa pemberian elisitor Cu^{2+} (kontrol). Hal ini mengindikasikan bahwa tidak ada pengaruh pada tekstur kalus tapak dara dengan pemberian elisitor Cu^{2+} . Tekstur kalus yang kompak, terbentuk pada kalus tapak dara diduga diakibatkan oleh akumulasi ZPT berupa 2,4-D dan kinetin yang diaplikasikan ke dalam media. Menurut Dwi, *et al.* (2012) tekstur kalus yang kompak dapat terbentuk akibat pengaruh ZPT sitokinin dan auksin terhadap potensial air dalam sel. Hal ini mengakibatkan penyerapan air dari media ke dalam sel meningkat dan mengakibatkan sel jadi lebih kaku. Morfologi kalus berupa warna dan tekstur kalus merupakan indikator visual perkembangan kalus dan menunjukkan sel-sel kalus yang aktif membelah. Induksi kalus pada kultur tanaman tapak dara menghasilkan kalus yang berwarna kuning pucat (*pale yellow*) yang merupakan indikasi kalus tumbuh dan selnya aktif.

Sidik ragam menunjukkan bahwa pemberian elisitor Cu^{2+} memberikan pengaruh signifikan pada taraf uji F 5 persen dan 1 persen pada bobot segar kalus. Hasil uji BNJ (5%) memperlihatkan bahwa bobot segar kalus paling tinggi ditunjukkan pada perlakuan Cu^{2+} 8 ppm sejumlah 0,679 g dan memberikan perbedaan nyata dengan perlakuan Cu^{2+} 0 ppm, 4 ppm dan 6 ppm. Tekstur kalus kompak yang terbentuk pada kalus tapak dara diduga disebabkan adanya akumulasi ZPT 2,4-D dan kinetin yang diberikan ke pada medium.

Bobot segar kalus juga menunjukkan hasil dari aktivitas metabolisme dan fotosintesis tumbuhan, karena hasil fotosintesis dipergunakan untuk membentuk sel-sel tanaman sehingga mempengaruhi berat basah tanaman. Jadi peningkatan bobot segar kalus tapak dara dengan penambahan elisitor Cu^{2+} menunjukkan peningkatan aktivitas fotosintesis dan aktivitas metabolisme. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan (Jannah, 2016) bahwa Cu^{2+} mampu meningkatkan proses fotosintesis karena Cu^{2+} berperan menyusun plastosianin yang adalah bagian penting pada transport elektron pada fotosintesis.

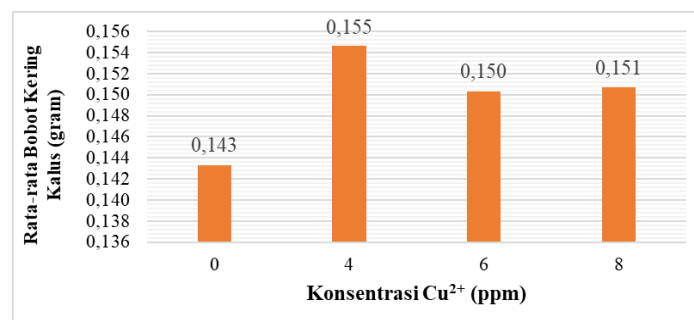
Tabel 2. Rata-rata Bobot Segar Kalus Tapak Dara pada Berbagai Konsentrasi Elisitor Cu^{2+} (gram)

Konsentrasi Cu^{2+} (ppm)	Rata-rata (g)
C0 (0)	0,161 ^c
C1 (4)	0,496 ^b
C2 (6)	0,434 ^b
C3 (8)	0,679 ^a

Keterangan: Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang berbeda (a,b,c) berarti berbeda nyata pada taraf uji BNJ 5 persen.

Sidik ragam menunjukkan bahwa aplikasi elisitor Cu^{2+} memberikan pengaruh tidak nyata pada taraf uji F 5 persen dan 1 persen pada bobot kering kalus serta kadar total senyawa flavonoid. Persentase bobot kering pada kalus tapak dara (Gambar 2) dari berbagai konsentrasi Cu^{2+} menunjukkan bahwa rata-rata bobot kering kalus tapak dara tertinggi (0,155 g) cenderung terjadi pada perlakuan Cu^{2+} dengan konsentrasi 4 ppm. berat kering kalus yang diperoleh pada media perlakuan (penambahan elisitor Cu^{2+} 4 ppm, 6 ppm dan 8 ppm) lebih tinggi dibandingkan kalus tanpa pemberian elisitor Cu^{2+} (kontrol) pada media. Peningkatan bobot kering kalus dikarenakan adanya peningkatan aktivitas metabolisme pada sel-sel penyusun kalus. Hal tersebut diduga disebabkan karena Cu adalah mikronutrien yang diperlukan untuk metabolisme dan enzimatik pada tumbuhan dan dapat mengoptimalkan penggunaan tembaga dalam jaringan. Hal ini diperkuat oleh hasil penelitian sebelumnya (Jannah, 2016) bahwa penambahan elisitor Cu^{2+} pada media jika dibandingkan dengan kontrol dapat meningkatkan bobot kering kalus *A. vulgaris*.

Umumnya, peningkatan bobot kering kalus sebanding dengan peningkatan bobot segarnya. Namun pada penelitian ini bobot kering yang diperoleh tidak menunjukkan beda nyata. Artinya, pada beberapa perlakuan, peningkatan bobot segar kalus tidak diikuti dengan peningkatan bobot keringnya. Menurut Wardani, Solichatun, dan Setyawan, (2004), hal ini disebabkan karena tiap sel mempunyai kemampuan penyerapan air yang berbeda. Sel-sel yang mempunyai bobot segar tinggi mengandung lebih banyak air, untuk itu saat pengeringan air yang terdapat dalam sel terkondensasi habis sehingga bobot kering yang dihasilkan juga lebih sedikit.

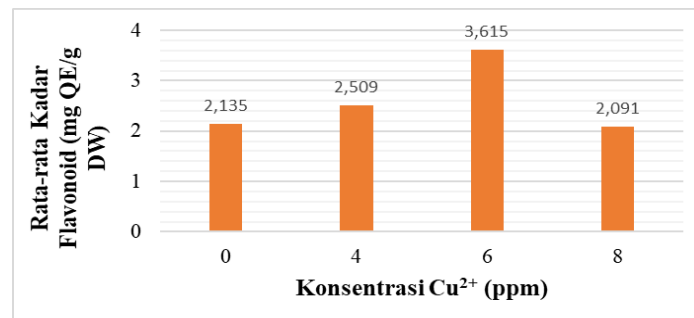


Gambar 2. Diagram Batang Rata-rata Bobot Kering pada Berbagai Konsentrasi Elisitor Cu^{2+}

Kadar Total Senyawa Flavonoid. Sidik ragam menunjukkan bahwa pemberian elisitor Cu^{2+} memberikan pengaruh tidak nyata pada taraf uji F 5 persen dan 1 persen pada kadar total senyawa flavonoid. Persentase kadar total senyawa flavonoid pada kalus tapak dara (Gambar 2) dari berbagai konsentrasi Cu^{2+} menunjukkan bahwa rata-rata kadar total senyawa flavonoid kalus tapak dara tertinggi (3,615 mg QE/g DW) cenderung terjadi pada perlakuan Elisitor Cu^{2+} dengan konsentrasi 6 ppm (C2). penambahan elisitor Cu^{2+} 4 ppm (C1) dan 6 ppm (C2) lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol (tanpa penambahan elisitor Cu^{2+}). Peningkatan kandungan flavonoid terjadi karena ion Cu^{2+} sebagai elisitor menyebabkan stress oksidatif. Dalam kondisi stress, ion Cu^{2+} merangsang respons pertahanan pada tumbuhan dengan mengaktifkan gen-gen tertentu dan memperkuat lintasan metabolisme sekunder. Hal ini sejalan sebagaimana penelitian yang dilakukan Sutini B *at al.* (2008), penambahan Cu^{2+} sebanyak 5 ppm meningkatkan kadar *flavan-3-ol* dalam kalus *Camellia sinensis* L. sebesar 12,5 persen dibandingkan dengan media tanpa pemberian Cu^{2+} .

Penambahan ion Cu^{2+} pada konsentrasi tertentu dikenali sebagai agen patogen sehingga keberadaannya menyebabkan kalus secara langsung menghasilkan senyawa H_2O_2 yang selanjutnya meningkatkan ROS. Hal tersebut dikarenakan logam Cu merupakan katalisator enzim yang membentuk ROS. Aktivitas ini akan direspon flavonoid untuk merangsang produksi antioksidan. Peningkatan ROS serta asam jasmonat dan metil jasmonat endogen menstimulir kalus menghasilkan senyawa fenolik yang dibantu

oleh enzim PAL, sebagai respons awal pada penyusunan senyawa fenolik tersebut (Retnaningati *et al.*, 2021), dimana flavonoid juga merupakan salah satu senyawa dari golongan fenolik (Sampepana, Apriadi and Rahmadi, 2020).



Gambar 3. Diagram Batang Rata-rata Kadar Total Senyawa Flavonoid pada Berbagai Konsentrasi Elisitor Cu²⁺

KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan elisitor Cu²⁺ 4 ppm, 6 ppm dan 8 ppm pada media pertumbuhan kalus tidak bersifat toksik pada kalus, sehingga sel-selnya masih aktif membelah. Yang ditunjukkan oleh kalus yang kompak dan berwarna kuning pucat kehijauan (*pale greenish yellow*). Penambahan Elisitor Cu²⁺ sebanyak 6 ppm mampu meningkatkan kandungan senyawa flavonoid pada kalus tapak dara. Hasil penelitian ini mengindikasikan bahwa Elisitor Cu²⁺ memiliki potensi untuk digunakan sebagai Elisitor dalam pengembangan senyawa sekunder pada tanaman obat.

UCAPAN TERIMA KASIH

Kami mengucapkan terima kasih kepada mahasiswa yang ikut terlibat langsung dalam penelitian ini, serta kepada semua pihak yang ikut serta berkontribusi. Kami menyampaikan terima kasih pula kepada Yayasan Wakaf UMI atas dukungan pendanaan yang diberikan untuk penelitian ini. Selain itu, kami juga menyampaikan apresiasi kepada Rektor dan Ketua LP2S Universitas Muslim Indonesia atas fasilitas dan dukungannya.

DAFTAR PUSTAKA

- Ariningsih, Solichatun, Anggarwulan, E. (2003) 'Callus growth and anthraquinones production of Indian mulberry (*Morinda citrifolia* L.) in Murashige-Skoogâ€™s medium (MS) supplemented with Ca²⁺ and Cu²⁺', *Biofarmasi Journal of Natural Product Biochemistry*, 1(2), pp. 39–43. doi:10.13057/biofar/f010201.
- Chang, C.C. *et al.* (2002) 'Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colometric methods', *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3), pp. 178–182. doi:10.38212/2224-6614.2748.
- Heryanto, A.F., Soegihardjo, C.J. and Purwijantiningsih, L.M.E. (2014) 'Optimalisasi Produksi Steviosida dari Kalus Daun *Stevia rebaudiana* Bertoni dengan Variasi Kombinasi Zat Pengatur Tumbuh', *E-Journal Universitas Atma Jaya Yogyakarta*, 10(1), pp. 1–52. doi:10.21608/pshj.2022.250026.
- Jannah, R., S.Z.A.N. (2016) 'Pengaruh pemberian elisitor Cu²⁺ terhadap kalus *Artemisia vulgaris* dalam upaya penyediaan artemisinin sebagai antimalaria', in *Prosiding Seminar Nasional Masyarakat Biodiversitas Indonesia*, pp. 155–158. doi:10.13057/psnmbi/m020206.

- Khan, H. *et al.* (2021) 'Chemical Elicitors-Induced Variation in Cellular Biomass, Biosynthesis of Secondary Cell Products, and Antioxidant System in Callus Cultures of *Fagonia indica*', *MDPI* [Preprint]. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8587688/pdf/molecules-26-06340.pdf>.
- Khoirunnisa, I. and Sumiwi, S.A. (2019) 'Review Artikel: Peran Flavonoid Pada Berbagai Aktifitas Farmakologi', *Farmaka*, 17(2), pp. 131–142. Available at: <https://jurnal.unpad.ac.id/farmaka/article/view/21922>.
- Made Dwi PYD, N. and Nengah Suwastika, I. (2012) 'Pengaruh penambahan air kelapa dan berbagai konsentrasi hormon 2,4-D pada medium MS dalam menginduksi kalus tanaman anggur hijau (*Vitis vinifera* L.)', *Jurnal Natural Science*, 1(1), pp. 53–62. Available at: <https://core.ac.uk/download/pdf/291813985.pdf>.
- Muhammady, A.R. (2017) *Peningkatan Produksi Flavonoid dan Aktivitas Antioksidan Kalus Stelechocarpus burahol [Blum] Hook. f. & Thomson Akibat Elisitor Sukrosa, Universitas Negeri Semarang*. Available at: <https://lib.unnes.ac.id/32349/1/4411411025.pdf>.
- Ningsih, I.Y. (2014) 'Pengaruh Elisitor Biotik dan Abiotik pada Produksi Flavonoid melalui Kultur Jaringan Tanaman', *Pharmacy*, 11(2), pp. 18–132. Available at: <https://jurnalnasional.ump.ac.id/index.php/PHARMACY/article/view/829>.
- Pandiangan, D. and Nainggolan, N. (2006) 'Peningkatan Kandungan Katarantin pada Kultur Kalus *Catharanthus roseus* dengan Pemberian Naphtalene Acetic Acid', *HAYATI Journal of Biosciences*, 13(3), pp. 90–94. doi:10.1016/S1978-3019(16)30299-6.
- Rady, M.R. *et al.* (2021) 'Anticancer compounds production in *Catharanthus roseus* by methyl jasmonate and UV-B elicitation', *South African Journal of Botany*, 142, pp. 34–41. doi:10.1016/j.sajb.2021.05.024.
- Retnaningati, D. *et al.* (2021) 'Pertumbuhan Kalus dan Produksi Katekin pada Kultur In Vitro Kalus Teh (*Camelia Sinensis* L.) dengan Penambahan Elisitor Ca²⁺ dan Cu²⁺', *Biota : Jurnal Ilmiah Ilmu-Ilmu Hayati*, 6(September), pp. 192–202. doi:10.24002/biota.v6i3.5278.
- Sampepana, E., Apriadi, R. and Rahmadi, A. (2020) 'Kandungan Fenolik, Flavonoid, Tanin dan Aktivitas Antioksidan Produk UKM Teh Tiwai di Kabupaten Kutai Kartanegara secara Spektrofotometer Uv-Vis', *Prosiding Seminar Nasional Pengabdian kepada Masyarakat*, 1, pp. 1–12. Available at: <http://journal.unj.ac.id/unj/index.php/snppm>.
- Setiawati, T. *et al.* (2021) 'Analisis Pertumbuhan dan Kandungan Total Flavonoid Kultur Kalus Krisan (*Chrysanthemum morifolium* Ramat) dengan Pemberian Asam 2,4-Diklorofenoksi Asetat (2,4-D) dan Air Kelapa', *Jurnal Pro-Life*, 8(1), pp. 32–44. Available at: <http://ejournal.uki.ac.id/index.php/prolife/article/view/2781/1776>.
- Shofiyani, A. and Hajoeningtjas, O.D. (2010) 'Pengaruh sterilan dan waktu perendaman pada eksplan daun kencur (*Kaemferia galanga* L) untuk meningkatkan keberhasilan kultur kalus', *Agritech*, 12(1), pp. 11–29. Available at: <https://media.neliti.com/media/publications/42066-ID-pengaruh-sterilan-dan-waktu-perendaman-pada-eksplan-daun-kencur-kaemferia-galang.pdf>.
- Silalahi, M. (2010) 'Elisitasi Peningkatan Produksi Ajmalisin oleh Kalus *Catharantus roseus* (L.) G. Don.', *Berita Biologi*, 10(3), pp. 305–311.
- Sulichantini, E.D. (2015) 'Produksi Metabolit Sekunder Melalui Kultur Jaringan', in *Prosiding Seminar Nasional Kefarmasian Ke-1*. Samarinda: Fakultas Farmasi, Universitas Mulawarman. Samarinsa, pp. 205–212. doi:<https://doi.org/10.25026/mpc.v1i1.27>.

- Sutini, B. *et al.* (2008) 'Meningkatkan Produksi Flavan-3-Ol melalui Kalus *Camellia sinensis* L. dengan Elisator Cu² plus', *Berkala Penelitian Hayati*, 14(1), pp. 39–44. doi:10.23869/bphjbr.14.1.20086.
- Verrananda I. M., Victoria Yulita F., Lizma Febrina, L.R. (no date) 'View of Identifikasi Metabolit Sekunder dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Bunga Tapak Dara (*Catharanthus roseus*).pdf', in *Prosiding Seminar Nasional Kefarmasian Ke-4 Tahun 2016*. Samarinda. Available at: <https://prosiding.farmasi.unmul.ac.id/index.php/mpc/article/view/176/176>.
- Wardani, D.P. and Solichatun, Setyawan, A.D. (2004) 'Growth and saponin production of *Talinum paniculatum* Gaertn. callus culture on various addition with 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) and kinetin', *Biofarmasi Journal of Natural Product Biochemistry*, 2(1), pp. 35–43. doi:10.13057/biofar/f020106.