

Pengaruh Kitosan terhadap Produksi Saponin Kultur Kalus Daun Ginseng Jawa (*Talinum paniculatum* (Jacq.) Gaertn.)

RIZKI WIJAYA¹, RATIH RESTIANI^{1*}, DWI ADITYARINI¹

¹Jurusan Biologi, Fakultas Bioteknologi, Universitas Kristen Duta Wacana

Jl. Dr. Wahidin Sudirohusodo No. 5-25 Yogyakarta, Indonesia. 55224

Email: ¹Rizkijofargis@gmail.com, ^{1*}Ratih.restiani@staff.ukdw.ac.id, ¹dwi.adityarini@staff.ukdw.ac.id

ABSTRACT

Javanese ginseng (*Talinum paniculatum*) has the potential to be developed as a medicinal raw material because it contains saponin ginsenosides similar to Korean ginseng (*Panax ginseng*). The application of elicitation to in vitro culture is a powerful technology to increase the productivity of *T. paniculatum* saponins efficiently. Chitosan is a biotic elicitor that is often used in elicitation because it can increase the production of secondary metabolites directly in the related key enzymes. This study aims to determine the effect of chitosan concentration and incubation time on callus biomass and saponin production in *T. paniculatum* callus culture. Production of *T. paniculatum* callus was carried out on MS medium with a combination of 2,4-D 2 mg/L and kinetin 3 mg/L. Elicitation was carried out on calluses that had entered the stationary phase with variations in the interaction treatment with chitosan concentrations of 0, 50, 100, and 150 mg/L and incubation times of 0, 3, 5, and 7 days (n = 3). The elicited dry callus was extracted with 96% ethanol and tested semi-quantitatively using thin layer chromatography (TLC). The elicited callus biomass at various concentrations of chitosan and incubation time (0.056-0.072) was not significantly different than the control (0.054). The largest TLC saponin stain area (0.495 cm²) was produced in the treatment of chitosan concentrations of 50 and 100 mg/L for 7 days. Through this research, it was found that chitosan elicitation treatment and incubation time did not affect the callus growth of *T. paniculatum* leaves. The highest saponin production was produced in chitosan elicitation treatment 100 mg/L for 7 days. This research is expected to contribute in increasing the production of *T. paniculatum* saponins.

Keywords: chitosan; elicitation; javanese ginseng; saponin; *Talinum paniculatum*

INTISARI

Ginseng jawa (*Talinum paniculatum*) potensial untuk dikembangkan sebagai bahan obat karena mengandung saponin ginsenosida yang mirip dengan ginseng korea (*Panax ginseng*). Penerapan elisitasi pada kultur in vitro merupakan salah satu teknologi yang mumpuni untuk meningkatkan produktivitas saponin *T. paniculatum* secara efisien. Kitosan merupakan elisitor biotik yang sering digunakan dalam elisitasi karena mampu meningkatkan produksi metabolit sekunder langsung pada enzim kunci terkait. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh konsentrasi kitosan dan waktu inkubasi terhadap biomassa kalus dan produksi saponin kultur kalus *T. paniculatum*. Produksi kalus *T. paniculatum* dilakukan pada media MS dengan kombinasi 2,4-D 2 mg/L dan kinetin 3 mg/L. Elisitasi dilakukan pada kalus yang telah memasuki fase stasioner dengan variasi interkasi perlakuan konsentrasi kitosan 0, 50, 100, dan 150 mg/L dan waktu inkubasi 0, 3, 5, dan 7 hari (n = 3). Kalus kering hasil elisitasi diekstraksi dengan etanol 96% dan diuji secara semi-kuantitatif menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT). Biomassa kalus terelisitasi pada berbagai variasi konsentrasi kitosan dan waktu inkubasi (0,056-0,072) tidak berbeda signifikan dibandingkan kontrol (0,054). Luas noda saponin KLT terbesar (0,495 cm²) dihasilkan pada perlakuan konsentrasi kitosan 50 dan 100 mg/L selama 7 hari. Melalui penelitian ini, diketahui bahwa perlakuan elisitasi kitosan dan waktu inkubasi tidak mempengaruhi pertumbuhan kalus daun *T. paniculatum*. Produksi saponin tertinggi dihasilkan pada perlakuan elisitasi kitosan 100 mg/L selama 7 hari. Penelitian ini diharapkan berkontribusi dalam peningkatan produksi saponin *T. paniculatum*

Kata kunci: elisitasi; ginseng jawa; kitosan; saponin; *Talinum paniculatum*

PENDAHULUAN

Tanaman ginseng jawa (*Talinum paniculatum* (Jacq.) Gaertn.) memiliki kandungan bahan aktif saponin ginsenosida yang mirip dengan ginseng korea (*Panax ginseng*) (Manuhara *et al.*, 2015). Ginsenosida diketahui memiliki efek pada sistem saraf pusat, imunitas, antidiabetes, dan antikanker (Yuan *et al.*, 2010). Penelitian mengenai peningkatan produksi senyawa aktif dari berbagai tanaman semakin meningkat. Hal ini dikarenakan proses produksi senyawa aktif secara konvensional dirasa belum optimal. Namun, produksi bahan baku obat berupa senyawa aktif dengan kuantitas dan kualitas yang tinggi merupakan suatu tantangan yang serius. Pada umumnya, produksi bahan aktif dari tanaman secara konvensional dipengaruhi oleh faktor genetik, lingkungan dan nutrisi media. Pasalnya, kualitas dan kuantitas bahan aktif yang dihasilkan oleh satu jenis tanaman dapat berbeda-beda tergantung lokasi tumbuh.

Kultur *in vitro* merupakan teknik budidaya tanaman secara aseptis pada suatu media kaya akan nutrisi di dalam laboratorium. Penerapan upaya elisitasi dalam kultur *in vitro* diketahui berkontribusi dalam peningkatan bahan aktif tanaman (Abouzid, 2014). Elisitor merupakan suatu faktor yang mempengaruhi peningkatan bahan aktif tanaman dalam proses elisitasi. Elisitor berperan dalam menghasilkan kelainan fisiologis tanaman dalam bentuk cekaman atau stres. Elisitor tergolong menjadi dua, yakni elisitor biotik yang dihasilkan dari unsur kehidupan, dan elisitor abiotik yang bukan dari komponen kehidupan. Kitosan merupakan elisitor biotik yang merupakan komponen struktural skeleton krustasea dan serangga serta dinding sel bakteri dan jamur. Kitosan berat molekul rendah banyak dipelajari untuk meningkatkan berbagai bahan aktif tanaman karena dipercaya mampu bekerja langsung pada enzim-enzim kunci yang berperan dalam sintesis bahan aktif tertentu (Patel & Krishnamuthy, 2013).

Peningkatan metabolit sekunder *T. paniculatum* dengan elisitasi sudah pernah dilakukan. Faizal (2019) yang berhasil meningkatkan kadar saponin pada akar *T. paniculatum* menggunakan metil jasmonat dan

asam salisilat. Namun elisitasi kultur kalus *T. paniculatum* menggunakan kitosan belum banyak diteliti, sehingga penelitian ini penting untuk dilakukan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh perlakuan elisitor kitosan dan waktu inkubasi terhadap pertumbuhan dan produksi saponin kultur kalus daun *T. paniculatum*.

METODE PENELITIAN

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi Dasar II Fakultas Bioteknologi Universitas Kristen Duta Wacana (UKDW), Yogyakarta. Penelitian dilakukan secara eksperimental dengan desain rancangan acak lengkap faktorial untuk menguji interaksi perlakuan konsentrasi kitosan dan waktu inkubasi terhadap pertumbuhan dan produksi saponin kultur kalus *T. paniculatum*. Alat yang digunakan untuk produksi kalus dan uji saponin adalah autoklaf, *Laminar air flow TLC Chamber* dan plat silica gel GF254 (Merck). Sedangkan bahan yang digunakan adalah eksplan daun *T. paniculatum* (urutan ke-2 atau ke-3 dari yang termuda, umur 3-4 minggu yang diambil di Laboratorium Biologi Dasar II Fakultas Bioteknologi UKDW), etanol (Merck), media MS 2,4-D (BDH) 2 mg/L dan kinetin (Sigma Aldrich) 3 mg/L, kitosan berat molekul rendah (Sigma-aldrich), isopropanol (Merck), saponin (Sigma-aldrich), dan larutan anisaldehyd.

Pembuatan Media *Murashige dan Skoog* (MS)

Pembuatan media MS dibagi menjadi dua, yakni media MS untuk produksi kalus dan media MS untuk perlakuan elisitasi. Dalam pembuatan 1000 mL media MS untuk produksi kalus memerlukan makronutrien, 5 mL larutan stok *iron*, 1 mL larutan stok mikronutrien, dan 4 mL larutan stok vitamin, 0,1 g myo-inositol, 3 g sukrosa, kombinasi ZPT 30 mL larutan stok kinetin 100 mg/L, dan 20 mL larutan stok 2,4-D 100 mg/L. Semua bahan pembuatan media MS dicampurkan dalam Erlenmeyer 2000 mL, kemudian ditambahkan akuades hingga volume akhir 1000 mL, lalu diaduk sampai tercampur rata. Selanjutnya pH larutan diukur dan diatur 5,7-5,8. Kemudian dicampurkan 8 g agar

sambil dipanaskan hingga terlarut sempurna. Sebanyak 20 mL media dituang ke dalam masing-masing botol kultur. Selanjutnya botol kultur ditutup rapat menggunakan *aluminium foil*, kertas perkamen, dan diikat menggunakan karet. Selanjutnya media MS dalam botol disterilisasi menggunakan autoklaf pada tekanan 1 atm, suhu 121°C selama 15 menit.

Pembuatan media elisitasi kitosan dibuat dengan bahan dan cara yang sama namun ditambahkan larutan stok kitosan 1000 mg/L pH 5,7 dengan volume yang bervariasi hingga diperoleh media MS dengan konsentrasi kitosan 50, 100, dan 150 mg/L. Dalam proses pembuatannya dilakukan sedikit modifikasi metode agar media elisitasi tidak menggumpal yakni dengan mensterilisasi media MS dan larutan stok kitosan menggunakan autoklaf secara terpisah, kemudian dicampurkan jadi satu dan dituang ke dalam botol asi steril di dalam *laminar air flow*. Larutan stok kitosan dibuat dengan cara menimbang sebanyak 0,2 g kitosan, kemudian ditambahkan asam asetat 0,1 % (v/v) secara perlahan hingga semua kitosan larut. Kemudian ditambahkan akuades sampai volume akhir 200 mL dan pH diatur menjadi 5,7-5,8.

Inokulasi/Produksi Kalus

Sebelum dilakukan inokulasi kalus, alat, bahan, dan ruang kerja *laminar air flow* terlebih dahulu disterilisasi. Prasterilisasi eksplan daun *T. paniculatum* dilakukan dengan cara merendamnya ke dalam larutan detergen 10% dan 3 tetes tween 80, kemudian dibilas dengan air mengalir dan akuades steril. Sterilisasi eksplan dilakukan dalam kondisi steril di ruang *laminar air flow* dengan cara eksplan *T. paniculatum* dimasukkan ke dalam alkohol 50 % (v/v) sambil digoyang perlahan selama tiga menit, kemudian dibilas dengan akuades steril sebanyak tiga kali dan dimasukkan ke dalam cawan petri steril. Kemudian, eksplan yang telah disterilisasi dipotong sejajar dengan tulang daunnya dengan ukuran 1 cm x 1 cm. Selanjutnya sebanyak 2 eksplan daun ditanam pada media MS dalam 1 botol kultur dengan cara bagian abaksial kontak dengan media. Kemudian botol kultur ditutup dengan *aluminium foil* dan *plastic wrap*. Inokulasi

eksplan dilakukan secara aseptis agar tidak menimbulkan agen kontaminan.

Pengamatan Pertumbuhan dan Fase Pertumbuhan Kalus

Pengamatan pertumbuhan kalus dilakukan sejak hari ke-0. Parameter yang diamati meliputi waktu inisiasi, persentase tumbuh, tekstur, dan warna kalus. Penentuan fase pertumbuhan kalus dilakukan dengan menimbang berat basah kalus dari tiga botol hasil sampling sejak hari ke-0 sampai kalus menunjukkan massa yang konstan. Selanjutnya kurva fase pertumbuhan kalus dibuat dengan memasukkan data massa kalus yang telah diukur ke dalam program pengolah angka *Microsoft Excel* dengan waktu sebagai sumbu x dan massa sebagai sumbu y.

Elisitasi dan Penentuan Biomassa Kalus

Elisitasi dilakukan dengan melakukan subkultur kalus yang berumur 58 hari ke dalam media perlakuan dengan konsentrasi kitosan dan waktu inkubasi yang telah ditentukan. Penentuan biomassa kalus terelisitasi dilakukan dengan menimbang berat kering kalus yang telah dikeringkan menggunakan oven pada suhu 50°C selama 24 jam. Data biomassa kalus dianalisis secara statistik dengan uji ANOVA taraf 5 % menggunakan program *IBM SPSS Statistics V21 x86*.

Ekstraksi Kalus

Ekstraksi kalus *T. paniculatum* dilakukan berdasarkan modifikasi metode penelitian Manuhara *et al.* (2015). Kalus dikeringkan menggunakan oven pada suhu 50°C selama 24 jam atau sampai berat keringnya konstan. Selanjutnya kalus dihaluskan dengan cara digerus menggunakan mortar. Bubuk kalus sebanyak 0,1 g diekstraksi dengan 10 mL etanol 96% (*analytical grade*), kemudian dipanaskan menggunakan *waterbath* suhu 80°C selama 45 menit. Ekstrak disaring dan sisa pelarut diuapkan menggunakan *waterbath* pada suhu 80°C sampai tersisa volume akhir 0,2 mL.

Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Saponin

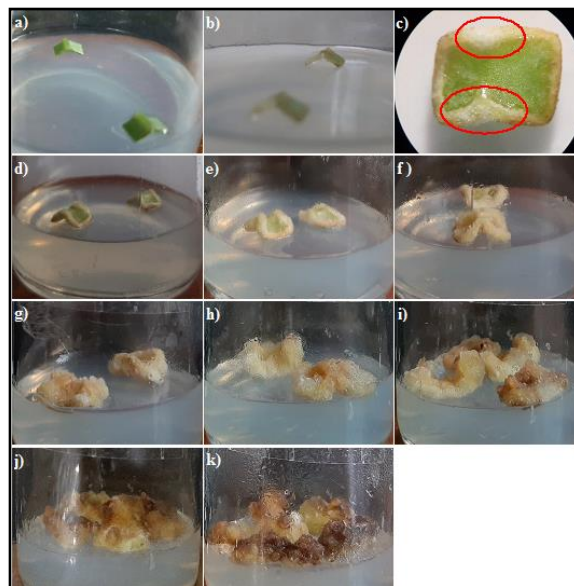
Uji KLT saponin dilakukan dengan modifikasi metode yang dilakukan Manuhara *et al.* (2015). Plat silika gel GF_{254} ditotol dengan 3 μ L ekstrak dan larutan standar saponin 5% menggunakan mikropipet. Sampel dielusi menggunakan fase gerak propanol dan air (14: 3) sampai bagian batas atas. Plat dikeringkan dan disemprot reagen anisaldehyd yang mengandung anisaldehyd 0,5 mL, asam asetat 10 mL, asam sulfat pekat 5 mL, dan etanol glasial 85 mL. Selanjutnya plat dipanaskan dalam oven suhu 105°C selama 10 menit. Hasil KLT diamati pada sinar tampak dan sinar UV 254 nm. Identifikasi noda KLT dilakukan dengan menghitung nilai *Retention factor* (Rf).

Kuantitas saponin ditentukan dengan modifikasi metode uji-semi kuantitatif Alwiyah *et al.* (2015) dengan penilaian intensitas warna dan perhitungan luas noda.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pertumbuhan Kalus *Talinum paniculatum*

Eksplan daun *Talinum paniculatum* ditumbuhkan pada media MS yang mengandung 2,4-D dan kinetin. Hal ini bertujuan untuk menginduksi pembentukan kalus. Menurut Herman (2019), kombinasi auksin dan kinetin memberikan induksi kalus maksimal 100% dengan kontaminasi 0%. Hasil pertumbuhan kalus *T. paniculatum* ditunjukkan pada Gambar 1 dan Tabel 1.



Gambar 1. Pertumbuhan kalus *T. paniculatum*. a) Eksplan (hari ke-0); b) Eksplan membengkak pada hari ke-1; c) Inisiasi kalus pada hari ke-5; d) Kalus umur 7 hari; e) Kalus umur 14 hari; f) Kalus umur 21 hari; g) Kalus umur 28 hari; h) Kalus umur 35 hari; i) Kalus umur 42 hari; j) Kalus umur 49 hari; dan k) Kalus umur 56 hari

Pada hari pertama setelah inokulasi, eksplan *T. paniculatum* tampak mengalami pembengkakan yang ditandai dengan bentuk eksplan yang melengkung ke atas (Gambar 1b). Pembengkakan eksplan terjadi akibat proses penyerapan cairan dan nutrisi dari media ke dalam sel-sel eksplan. Inisiasi kalus *T. paniculatum* terjadi pada hari ke-5 setelah inokulasi. Hal ini ditandai dengan munculnya bakal kalus yang berwarna putih pada kedua ujung tulang daun eksplan (Gambar 1c). Diduga, inisiasi kalus *T. paniculatum*

disebabkan karena terjadinya penyerapan cairan dan nutrisi dari media ke dalam eksplan pada saat eksplan mengalami pembengkakan pada hari pertama setelah inokulasi yang berimplikasi dengan tersedianya zat pengatur tumbuh (ZPT) 2,4-D dan kinetin yang seimbang (baik secara endogen maupun eksogen) yang mendukung pembentukan kalus. Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian Sugiyarto & Kuswandi (2014), bahwa penambahan 2,4-D 2 mg/L pada media MS mampu menginisiasi kalus daun Binahong

dalam kurun waktu 5 hari. Menurut Rahayu *et al.* (2003), auksin jenis 2,4-D sering digunakan dalam induksi kalus karena bersifat lebih stabil sehingga efektif untuk menginisiasi kalus.

Selain itu, kinetin juga berperan dalam inisiasi sel kalus dengan menstimulasi terjadinya pembelahan sel dan morfogenesis sel eksplan daun *T. paniculatum*.

Tabel 1. Persentase pertumbuhan, tekstur dan warna kalus *T. paniculatum* dalam media MS + 2,4-D 2 mg/L dan kinetin 3 mg/L selama 8 minggu

Waktu Pengamatan (minggu ke-)	Persentase Pertumbuhan (%)	Parameter	
		Tekstur	Warna
0	0	-	-
1	31,7	Kompak	Putih
2	95,6	Kompak	Putih
3	97,5	kompak	Putih kekuningan
4	100	Remah	Putih kecoklatan
5	100	Remah	Bening kecoklatan dan hijau
6	100	Remah	Bening kecoklatan dan hijau
7	100	Remah	Bening kecoklatan dan kuning kehijauan
8	100	Remah	Putih, bening kehijauan, dan coklat tua

Pertumbuhan maksimal kalus *T. paniculatum* terjadi pada minggu ke-4. Hal ini ditandai dengan tumbuhnya kalus pada 8 sisi eksplan (Gambar 1g dan Tabel 1). Pada minggu ke-1 sampai minggu ke-3 kalus *T. paniculatum* memiliki tekstur yang cenderung pipih dan rapat. Kemudian, pada minggu ke-4 tekstur kalus, *T. paniculatum* berubah menjadi remah dengan bentuk kalus yang tidak beraturan, terdapat ruang antar kalus, dan tampak berair (Tabel 1). Perubahan tekstur kalus diakibatkan penyerapan nutrisi secara maksimal sehingga meningkatkan volume setiap sel kalus.

Pengamatan warna kalus dilakukan untuk mengetahui aktivitas pigmentasi kalus. Pada pengamatan warna, perubahan warna kalus dari putih menjadi kekuningan terjadi dari minggu ke-2 hingga minggu ke-3 (Gambar 2f dan Tabel 1). Warna kuning pada kalus disebabkan kalus kekurangan asupan cahaya sehingga klorofil tidak berkembang dengan baik. Selain itu, warna kekuningan pada kalus dapat disebabkan oleh tingginya konsentrasi 2,4-D sehingga pembentukan zat hijau daun (klorofil) terhambat (Rahayu *et al.*, 2003). Kemudian, dari minggu ke-3 ke minggu ke-4 terjadi perubahan warna kalus menjadi kecoklatan yang ditandai munculnya warna coklat muda pada bagian tengah kalus (Gambar 1g dan Tabel 1). Perubahan warna kalus dari kekuningan menjadi kecoklatan diduga terjadi karena kalus mulai menua. Rahayu *et al.* (2003)

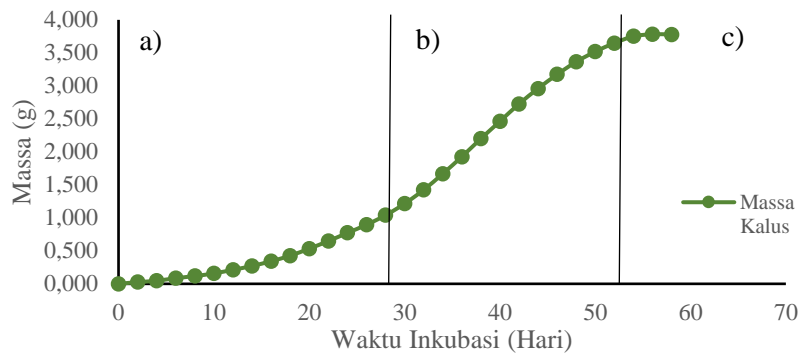
menyatakan fase awal penuaan kalus ditandai oleh warna kecoklatan pada kalus akibat berkurangnya nutrisi pada media. Selanjutnya pada minggu ke-5 tampak muncul warna hijau pada kalus. Hal ini disebabkan penurunan konsentrasi 2,4-D dalam proses pertumbuhan, sehingga tidak menghambat pertumbuhan dan perkembangan klorofil pada kalus. Selain itu, warna hijau pada kalus diduga terjadi karena perlakuan intensitas cahaya penuh selama 24 jam yang menyebabkan terjadinya pembentukan klorofil pada kalus yang telah berumur 5 minggu. Rahayu *et al.* (2003) menyatakan warna hijau pada kalus disebabkan aktivitas pigmentasi yang berubah-ubah. Pengamatan warna pada minggu ke-6 sampai minggu ke-8 hanya menunjukkan warna semakin gelap yang menandakan penuaan kalus. Namun pada minggu ke-8 juga muncul kalus yang berwarna putih yang merupakan kalus muda yang baru tumbuh (Gambar 2i, j, k dan Tabel 1). Hal ini disebabkan oleh ketersediaan produk metabolit primer pada kalus yang mendukung terjadinya pertumbuhan kalus baru walaupun nutrisi media sudah menipis pada minggu ke-8.

Fase Pertumbuhan Kalus *Talinum paniculatum*

Pertumbuhan kalus terbagi dalam tiga fase yaitu fase lag, log dan stasioner (Trimulyono *et al.*, 2004). Fase pertumbuhan

umumnya ditunjukkan dalam suatu kurva pertumbuhan. Kurva pertumbuhan kalus *T.*

paniculatum yang telah dielisitasi ditunjukkan pada Gambar 2.



Gambar 2. Fase pertumbuhan kalus *Talinum paniculatum*

Fase lag atau adaptasi kalus *T. paniculatum* terjadi pada hari ke-0 sampai hari ke-28 yang ditandai dengan pertambahan massa yang rendah dan terjadi dalam waktu yang cukup lama (Gambar 2a). Pada fase lag, kalus masih beradaptasi terhadap lingkungan dan nutrisi media yang menyebabkan pertumbuhan kalus masih sangat rendah. Selanjutnya pada hari ke-30 sampai hari ke-52 kalus *T. paniculatum* memasuki fase log atau pertumbuhan secara eksponensial yang ditunjukkan dengan pertambahan massa dua kali lipat dalam waktu yang relatif lebih singkat dibandingkan pada fase lag (Gambar 2b). Hal ini diduga terjadi karena kalus telah terbiasa dengan lingkungan dan nutrisi dalam media sehingga kalus menyerap cairan dan nutrisi media untuk menghasilkan metabolit primer dan biomassa yang tinggi. Fase stasioner kalus *T. paniculatum* teramati terjadi pada hari ke-54 sampai hari ke-58 yang ditandai dengan pertambahan massa yang sedikit dan cenderung konstan sehingga menunjukkan garis datar pada kurva fase pertumbuhan (Gambar 2c). Hal ini dikarenakan nutrisi dalam media mulai menipis yang menyebabkan pertumbuhan kalus mulai

melambat. Oleh karena itu elisitasi kalus *T. paniculatum* dilakukan pada hari ke-58 yakni fase stasioner terakhir. Darhani (2006), menunjukkan bahwa fase stasioner pertumbuhan pada kalus akar *T. paniculatum* pada media MS + ZPT 2,4-D 2 mg/L terjadi setelah hari ke-20. Perbedaan hasil penelitian mungkin disebabkan perbedaan sumber eksplan yang digunakan. Menurut Wardani *et al.* (2004), pertumbuhan kalus dipengaruhi oleh kecepatan pembelahan sel yang dipengaruhi oleh nutrisi media dan ZPT, gen tanaman, umur jaringan, jenis tanaman dan juga faktor lingkungan seperti intensitas cahaya, temperatur dan kelembaban.

Pengaruh Elisitasi Kitosan terhadap Pertumbuhan Kalus *Talinum paniculatum*

Pengaruh elisitasi terhadap pertumbuhan kalus *T. paniculatum* diukur berdasarkan biomassa kalus. Pengukuran dilakukan dengan menimbang berat kering kalus. Data pengukuran dianalisis secara statistik untuk mengetahui signifikansi pengaruh konsentrasi kitosan dan waktu inkubasi. Data yang diperoleh disajikan pada Gambar 3.



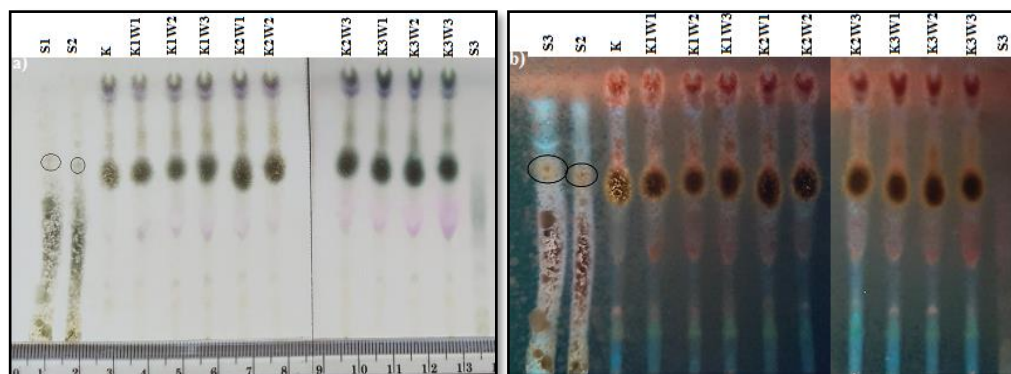
Gambar 3. Pengaruh perlakuan elisitasi kitosan dan waktu inkubasi terhadap biomassa kalus *Talinum paniculatum*. Keterangan: BB = berat basah; Kontrol = tanpa penambahan kitosan; K₁ = kitosan 50 mg/L; K₂ = kitosan 100 mg/L; K₃ = Kitosan 150 mg/L; W₀ = waktu inkubasi 0 hari; W₁ = waktu inkubasi 3 hari; W₂ = waktu inkubasi 5 hari; W₃ = waktu inkubasi 7 hari

Berdasarkan Gambar 3, biomassa kontrol (0,054) lebih rendah dibandingkan biomassa elisitasi (0,056-0,072). Hal ini menunjukkan bahwa elisitasi kitosan dan waktu inkubasi berpengaruh terhadap peningkatan biomassa kalus *T. paniculatum*. Hal ini mungkin dikarenakan kalus *T. paniculatum* yang diberi perlakuan elisitasi pada media baru dapat menyerap nutrisi sehingga terjadi pertumbuhan kalus baru yang berimplikasi pada pertambahan biomassa. Hasil uji ANOVA menunjukkan peningkatan biomassa kalus *T. paniculatum* akibat elisitasi tidak signifikan ($p > 5\%$). Taha *et al.* (2016) menunjukkan penurunan biomassa kultur suspensi kalus *Brassica rapa* L. setelah dielisitasi kitosan konsentrasi 25-150 mg/L dibandingkan kontrol. Perbedaan hasil yang diperoleh pada penelitian ini dengan penelitian yang dilakukan oleh Taha

et al. (2016) mungkin disebabkan oleh perbedaan kondisi kultur yang digunakan. Pada penelitian ini, kondisi kultur yang digunakan adalah kultur kalus pada media padat, yang berakibat pada rendahnya interaksi sel kalus dengan elisitor kitosan pada media sehingga elisitasi tidak berjalan maksimal.

Analisis Saponin dengan KLT

Penentuan kuantitas saponin diukur berdasarkan pengamatan intensitas warna secara visual. Data tersebut digunakan sebagai data referensi atau pendukung karena memiliki nilai subjektivitas yang tinggi. Selain itu, juga dilakukan pengukuran luas noda untuk menentukan kuantitas saponin. Hasil analisis saponin *T. paniculatum* ditunjukkan pada Gambar 4.



Gambar 4. Profil kromatogram ekstrak kalus *Talinum paniculatum*, a) pada sinar tampak; b) pada UV 254 nm. Keterangan: S1 = standar saponin dalam air (5%); S2 = standar saponin dalam etanol (5%); S3 = standar saponin dalam air (1%); K = kontrol/kitosan 0 mg/L; K₁ = Kitosan 50 mg/L; K₂ = kitosan 100 mg/L; K₃ = kitosan 150 mg/L; W₀ = waktu inkubasi 0 hari; W₁ = waktu inkubasi 3 hari; W₂ = waktu inkubasi 5 hari; W₃ = waktu inkubasi 7 hari

Sampel ekstrak kalus *T. paniculatum* dan kontrol menghasilkan noda yang berbentuk oval dan berwarna hijau gelap dengan ukuran yang bervariasi (Gambar 4a). Noda tersebut

diduga merupakan saponin. Manuhara *et al.* (2015) menyatakan bahwa noda saponin akan berwarna hijau pekat setelah disemprot reagen anisaldehyd.

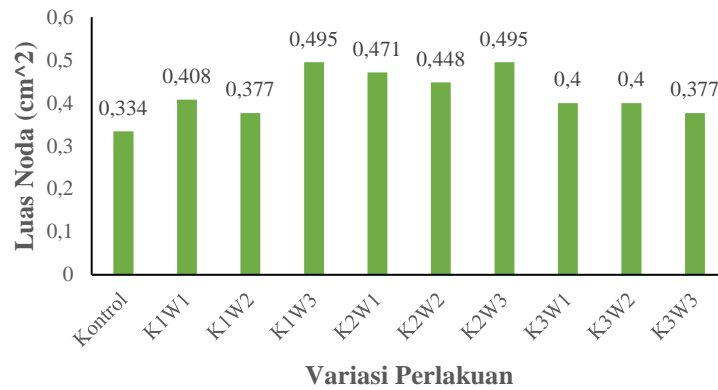
Tabel 2. Data pengamatan sampel pada uji KLT

Sampel KLT	Rf	Warna
Standar saponin 1 (5%)	0,625	1
Standar saponin 2 (5%)	0,613	1
Standar saponin 3 (1%)	-	-
Kontrol	0,575	2
K ₁ W ₁	0,588	2
K ₁ W ₂	0,588	3
K ₁ W ₃	0,588	3
K ₂ W ₁	0,563	2
K ₂ W ₂	0,575	2
K ₂ W ₃	0,600	4
K ₃ W ₁	0,575	5
K ₃ W ₂	0,575	5
K ₃ W ₃	0,575	5

Keterangan: Angka 1 sampai 5 pada penilaian warna noda menunjukkan warna paling pudar hingga pekat (mengandung saponin dalam jumlah sedikit - banyak)

Nilai Rf standar saponin 1 dan 2 (0,625 dan 0,613), noda perlakuan kontrol (0,575), dan noda perlakuan elisitasi (0,575-0,6) tidak jauh berbeda (Tabel 2). Hal ini menunjukkan bahwa noda yang dihasilkan dari sampel ekstrak kalus kontrol dan perlakuan elisitasi merupakan senyawa saponin. Hasil penelitian yang dilakukan oleh Rahmawati (2016) juga menunjukkan Rf standar saponin sedikit lebih tinggi dibandingkan Rf ekstrak sampel pada kromatogram. Perbedaan nilai Rf diduga terjadi karena lepasnya ikatan gula (glikosida) saponin pada sampel ekstrak kalus *T. paniculatum* kontrol dan kombinasi perlakuan elisitasi selama proses ekstraksi yang melibatkan pemanasan pada suhu 80°C. Nilai Rf perlakuan elisitasi tertinggi (0,6) dan paling mendekati nilai Rf standar saponin 1 dan 2 (0,625 dan 0,613) dihasilkan pada interaksi perlakuan elisitasi kitosan 100 mg/L (K₂W₃) dengan waktu inkubasi 7 hari. Hal ini diduga karena senyawa saponin yang dihasilkan pada ekstrak perlakuan elisitasi kitosan 100 mg/L dan waktu inkubasi 7 hari memiliki kemurnian paling tinggi dibandingkan sampel perlakuan elisitasi lainnya. Hal ini menyebabkan ekstrak yang dihasilkan memiliki sifat polaritas yang sama dengan standar saponin sehingga menghasilkan nilai Rf yang paling mirip.

Penentuan kuantitas saponin berdasarkan penilaian warna menunjukkan bahwa nilai warna noda saponin tertinggi (5 dari 5) dihasilkan pada interaksi perlakuan elisitasi kitosan 150 mg/L dan waktu inkubasi 3, 5, dan 7 hari (K₃W₁, K₃W₂, dan K₃W₃). Hal ini menunjukkan bahwa produksi saponin paling tinggi dihasilkan pada interaksi perlakuan elisitasi kitosan 150 mg/L dan waktu inkubasi 3, 5, dan 7 hari. Penelitian elisitasi kitosan pada kultur suspensi *Psoralea corylifolia* yang dilakukan oleh Ahmed *et al.* (2014) menunjukkan hasil berbeda, di mana terjadi penurunan senyawa psoralen saat diberi perlakuan elisitasi kitosan 150 mg/L. Hal ini menunjukkan ada perbedaan hasil elisitasi kitosan pada kultur kalus *T. paniculatum* dengan kultur suspensi *Psoralea corylifolia*. Perbedaan hasil mungkin disebabkan oleh spesies tanaman atau karena kondisi kultur yang berbeda. Kemudian, nilai warna noda saponin tertinggi kedua (4 dari 5) dihasilkan pada interaksi perlakuan elisitasi kitosan 100 mg/L dan waktu inkubasi 7 hari (K₂W₃). Hal ini menunjukkan bahwa kuantitas saponin yang dihasilkan pada interaksi perlakuan perlakuan elisitasi kitosan 100 mg/L dan waktu inkubasi 7 hari cukup tinggi.



Gambar 5. Luas noda saponin ekstrak kalus hasil elisitasi pada KLT

Penentuan kuantitas saponin berdasarkan pengukuran luas noda menunjukkan bahwa luas noda saponin terbesar (0,495 cm²) dihasilkan pada interaksi perlakuan elisitasi kitosan 50 dan 100 mg/L dan waktu inkubasi 7 hari (K₁W₃ dan K₂W₃). Hal ini dimungkinkan karena kitosan berat molekul rendah konsentrasi 50 mg/L dan 100 mg/L selama 7 hari mampu menginduksi enzim kunci yang mendukung pembentukan saponin. Xianyang *et al.* (2004) menyatakan bahwa kitosan diduga mengaktifkan *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) pada *P. ginseng*. Aktivasi MAPK meningkatkan aktivitas membran plasma NADPH oksidase dan ROS. Hidrogen peroksida yang dihasilkan menjadi molekul sinyal untuk menginduksi sintesis enzim kunci *Squalene Synthase* (SS), *Squalene Epoxidase* (SE), dan *β-amyrin Synthase* (β-AS) yang menyebabkan terbentuknya saponin. Konsentrasi kitosan sebesar 100 mg/L terbukti dapat meningkatkan produksi beberapa metabolit sekunder, seperti triterpenoid dari kultur suspensi *Betula platyphylla* (Fan *et al.*, 2010), fenolik pada kultur *B. rapa* (Taha *et al.*, 2016) dan alkaloid pada kultur kalus *Catharanthus roseus* (Pliankong *et al.*, 2018). Akan tetapi, konsentrasi kitosan yang lebih tinggi yaitu 250 mg/L justru menurunkan produksi saponin ginsenoside pada kultur *P. ginseng* (Palazon *et al.*, 2003).

KESIMPULAN

Kesimpulan yang diperoleh pada penelitian ini adalah tidak ada pengaruh konsentrasi kitosan dengan waktu inkubasi yang signifikan terhadap pertumbuhan kalus *T.*

paniculatum. Selain itu, perlakuan elisitasi kitosan konsentrasi 100 mg/L dengan waktu inkubasi 7 hari diduga menghasilkan produksi saponin tertinggi yang dibuktikan dengan luas noda saponin terbesar (0,495 cm²), nilai Rf sampel yang paling mendekati standar saponin (0,06), dan penilaian intensitas warna yang tergolong tinggi (4 dari 5). Untuk pengembangan penelitian elisitasi kalus *T. paniculatum* disarankan menggunakan kitosan berat molekul rendah 100 mg/L dengan waktu inkubasi 7 hari dan dilanjutkan dengan isolasi saponin hasil elisitasi kultur kalus *T. paniculatum*, uji densitometer, dan uji serapan spektrofotometri UV-VIS untuk mengetahui konsentrasi saponin secara lebih akurat.

DAFTAR PUSTAKA

- Abouzid, S. 2014. Yield improvement strategies for the production of secondary metabolites in plant tissue culture: silymarin from *Silybum marianum* tissue culture. *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters*. vol 28 (23): 2102-2110. doi:10.1080/14786419.2014.927465.
- Ahmed, SA and Baig, MMV. 2014. Biotic elicitor enhanced production of psoralen in suspension culture of *Psoralea corylifolia* L. *Saudi Journal of Biological Sciences*. vol 21(5): 499-504. doi: 10.1016/j.sjbs.2013.12.008.
- Alwiyah, A., Manuhara, YSW., dan Utamy, ESW. 2015. Pengaruh intensitas cahaya terhadap biomassa dan kadar saponin kalus ginseng jawa (*Talinum paniculatum* Gaertn.) pada berbagai waktu kultur. *Journal Ilmiah Biologi*. vol 3(1): 56-66.
- Darhani, CR. 2006. Profil pertumbuhan dan analisis kualitatif glikosida saponin kalus umbi akar ginseng jawa (*Talinum paniculatum* (Jacq.) Gaertn.) pada medium Murashige-Skoog dengan variasi konsentrasi asam 2,4-diklorofenoksiasetat.

- [Skripsi]. Yogyakarta: Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma.
- Faizal, A. 2019. Enhancement of saponin accumulation in adventitious root culture of javanese ginseng (*Talinum paniculatum* Gaertn.) through methyl jasmonate and salicylic acid elicitation. *African Journal of Biotechnology*. vol 18(6): 130-135. doi:10.5897/AJB2018.16736.
- Fan, G., Li, X., Wang, X., Zhai, Q., and Zhan, Y. 2010. Chitosan activates defense responses and triterpenoid production in cell suspension cultures of *Betula platyphylla* Suk. *African Journal of Biotechnology*. vol 9(19): 2816-2820. doi:10.5897/AJB09.1975.
- Herman, KN. 2019. Optimasi sterilisasi dan induksi kalus pada ginseng jawa (*Talinum paniculatum* Gaertn.). [Skripsi]. Yogyakarta: Fakultas Bioteknologi Universitas Kristen Duta Wacana.
- Manuhara, YSW., Kristanti, AN., Utami, ESW., and Yachya, A. 2015. Effect of sucrose and potassium nitrate on biomass and saponin content of *Talinum paniculatum* Gaertn. hairy root in balloon-type bubble bioreactor. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. Vol 5(12): 1027-1032. doi: 10.1016/j.apjtb.2015.09.009.
- Palazon, J., Cusido, RM., Bonfill, M., Mallol, A., Moyano, E., Morales, C., and Pinol, MT. 2003. Elicitation of different *Panax ginseng* transformed root phenotypes for an improved ginsenoside production. *Plant Physiology and Biochemistry*. 41 (11-12): 1019-1025. doi: 10.1016/j.plaphy.2003.09.002.
- Patel, H and Krishnamurthy, R. 2013. Elicitor in plant tissue culture. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. vol 2(2): 60-65.
- Pliankong, P., Suksa-Ard, P., and Wannakrairoj, S. 2018. Chitosan elicitation for enhancing of vincristine and vinblastine accumulation in cell cultur of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Journal of Agricultural Science*. vol 10(12): 287-293. doi: 10.5539/jas.v10n12p287.
- Rahayu, B., Solichatun, dan Anggarwulan, E. 2003. Pengaruh asam 2,4-diklorofenoksiasetat (2,4-D) terhadap pembentukan dan pertumbuhan kalus serta kandungan flavonoid kultur kalus *Acalypha indica* L. *Biofarmasi*. 1(1): 1-6. doi: 10.13057/biofar/f010101.
- Rahmawati, BD. 2016. Profil kadar saponin pada beberapa bagian umbi akar *Talinum paniculatum* hasil kultivasi petani di daerah Plosoklaten Kediri. [Skripsi]. Kediri: Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan. Universitas Nusantara Persatuan Guru Republik Indonesia.
- Sugiyarto, L dan Kuswandi, PC. 2014. Pengaruh 2,4-diklorofenoksiasetat (2,4-D) dan benzyl aminopurin (BAP) terhadap pertumbuhan kalus daun Binahong (*Anredera cordifolia* L.) serta analisis kandungan flavonoid total. *Jurnal Penelitian Saintek*. vol 19 (1): 23-30.
- Taha, H., El-Ghit, HMA., and Fatahallah, AMA. 2016. Application of elicitation process for achievement of phenol and α -tocopherol accumulation rates in suspension cultures of *Brassica rapa* L.. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. vol 7(1): 870-877.
- Trimulyono, G., Solichatun., dan Marlina, SD. 2004. Pertumbuhan kalus dan kandungan minyak atsiri nilam (*Pogostemon cablin* (Blanco) Bth.) dengan perlakuan asam naftalen asetat (NAA) dan kinetin. *Biofarmasi*. Vol 2(1): 9-14. doi: 10.13057/biofar/f020102.
- Wardani, DP/. Solichatun., dan Setyawan, AD. 2004. Pertumbuhan dan produksi saponin kalus *Talinum paniculatum* Gaertn. pada variasi penambahan asam 2,4 diklorofenoksi asetat (2,4-D) dan kinetin. *Biofarmasi*. vol 2(1): 35-43. doi: 10.13057/biofar/f020106.
- Xianyang, H., Neill, SJ., Jianying, F., Weiming, C., and Zhangcheng, T. 2004. Mitogen-activated protein kinase mediate the oxidative burst and saponin synthesis induced by chitosan in cell cultures of *Panax ginseng*. *Science in China Series C Life Science*. vol 47(4): 303-312. doi: 10.1360/03yc0074.
- Yuan, CS., Wang, CZ., Wicks, SM., and Qi, LW. 2010. Chemical and pharmacological studies of saponin with a focus on american ginseng. *Journal of Ginseng Research*. vol 34(3): 160-167. doi: 10.5142/jgr.2010.34.4.160.