

## Elisitasi Saponin dalam Kultur Kalus Ginseng Jawa (*Talinum paniculatum* Gaertn.) Menggunakan Asam Salisilat

### *Elicitation of Saponin in Callus Culture of Javanese Ginseng (Talinum paniculatum Gaertn.) using Salicylic Acid*

Putri Pono<sup>1</sup>, Ratih Restiani<sup>1\*</sup>, dan Dwi Aditriyarni<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Fakultas Bioteknologi, Universitas Kristen Duta Wacana, Yogyakarta, Indonesia

#### Abstrak

Ginseng Jawa (*Talinum paniculatum* Gaertn.) digunakan dalam pengobatan tradisional karena mengandung senyawa metabolit sekunder berupa saponin, tannin, alkaloid, kuinon, steroid, polifenol, flavonoid, dan minyak atsiri. Dari beberapa senyawa metabolit sekunder tersebut, saponin merupakan metabolit sekunder yang dominan dihasilkan oleh ginseng jawa dan diketahui memiliki banyak efek farmakologi. Elisitasi melalui kultur *in vitro* khususnya kultur kalus dapat digunakan dalam upaya meningkatkan kandungan saponin menggunakan asam salisilat. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh konsentrasi asam salisilat dan waktu elisitasi terhadap pertumbuhan kalus dan produksi saponin dalam kultur kalus *Talinum paniculatum*. Induksi dan produksi kalus *T. paniculatum* menggunakan media MS dengan kombinasi 2,4-D 2 mg/L + kinetin 3 mg/L. Kalus yang telah memasuki fase stationer (pada hari ke 58) digunakan untuk proses elisitasi. Elisitasi kalus menggunakan variasi konsentrasi asam salisilat 0,5 mM, 0,10 mM, 0,15 mM, 0,20 mM, 0,25 mM, 0,30 mM, 0,35 mM dan waktu inkubasi 3 hari, 6 hari, dan 9 hari. Ekstrak kalus selanjutnya diidentifikasi menggunakan KLT untuk mengetahui kandungan saponinnya melalui luas noda saponin. Penambahan konsentrasi asam salisilat sebesar (0,05 – 0,35 mM) dan waktu elisitasi (3-9 hari) pada kultur kalus *T. paniculatum* berpengaruh terhadap peningkatan biomassa kalus (0,056 – 0,069 gram) dibandingkan kontrol (0,054 gram) dan kandungan saponin dalam kalus. Kandungan saponin tertinggi sebesar 0,565 cm<sup>2</sup> pada perlakuan konsentrasi asam salisilat 0,30 mM dengan waktu inkubasi 6 hari.

**Kata kunci :** elisitasi, asam salisilat, kultur *in vitro*, *T. paniculatum*, saponin

#### Abstract

*Talinum paniculatum* Gaertn. is a plant that is efficacious in traditional medicine because of its secondary metabolite compounds content, such as saponins, tannins, alkaloids, quinine, steroids, polyphenols, flavonoids, and essential oils. To increase the production of saponin from *T. paniculatum* through *in vitro* culture, an effective method such as elicitation is needed. Salicylic acid is an abiotic elicitor that is often used to increase the production of secondary metabolites. This study aimed to find out the influence of salicylic acid concentration and elicitation time on biomass of callus and saponin accumulation in *T. paniculatum* leaf explants. Callus production of *T. paniculatum* was carried out in MS medium with a combination of 2,4-D 2 mg/L and kinetin 3 mg/L. Elicitation was performed on callus that has entered the stationary phase with variations in the treatment of salicylic acid concentrations of 0.5 mM, 0.10 mM, 0.15 mM, 0.20 mM, 0.25 mM, 0.30 mM, and incubation times of 3 days, 6 days, and 9 days. Dried callus was then extracted and tested using Thin Layer Chromatography (TLC) to determine its saponin content. The addition of salicylic acid concentration (0.05 – 0.35 mM) and elicitation time (3-9 days) in *T. paniculatum* callus culture had an effect on increasing callus biomass (0.056 – 0.069 grams) compared to control (0.054 grams). The largest TLC saponin stain area (0.565 cm<sup>2</sup>) was produced at salicylic acid concentration treatment of 0.30 mM with an incubation time of 6 days.

**Keywords:** elicitation, salicylic acid, *in vitro* culture, *T. paniculatum*, saponin.

---

#### \*Corresponding author:

Ratih Restiani

Fakultas Bioteknologi Universitas Kristen Duta Wacana

Jl. Wahidin Sudirohusodo 5-25 Yogyakarta, Indonesia 55224

Email :ratih.restiani@staff.ukdw.ac.id,

## Pendahuluan

*Talinum paniculatum* Gaertn. atau yang dikenal dengan nama Ginseng Jawa merupakan salah satu tanaman yang digunakan sejak dahulu dalam pengobatan tradisional. *T. paniculatum* mengandung senyawa metabolit sekunder berupa saponin, tannin, alkaloid, kuinon, steroid, polifenol, flavonoid, dan minyak atsiri (Setyani, 2016). Saponin merupakan salah satu metabolit sekunder yang terakumulasi paling banyak pada bagian akar *T. paniculatum* serta diketahui memiliki efek farmakologi sebagai afrodisiak dan analog dengan ginsenoside yang dimiliki oleh Ginseng Korea (Faizal and Sari, 2019; Manuhara *et al.*, 2015). Pemanfaatan saponin *T. paniculatum* dalam bidang farmasi membutuhkan konsistensi kuantitas maupun kualitas senyawa metabolit sekundernya. Perbanyakkan vegetatif secara tradisional tidak dapat menjamin kualitas dan kuantitas metabolit sekunder yang optimal. Oleh karena itu, dibutuhkan metode lain yaitu melalui elisitasi kultur *in vitro* untuk mengoptimalkan kuantitas serta kualitas metabolit sekunder.

Kultur *in vitro* merupakan salah satu metode yang dapat digunakan dalam memproduksi metabolit sekunder. Kelebihan kultur *in vitro* dalam memproduksi metabolit sekunder yaitu tidak membutuhkan waktu yang lama dalam membudidayakan tanaman, memerlukan lahan yang relatif terbatas, waktu kultur yang relatif singkat dan metabolit sekunder yang dihasilkan dapat terjamin kuantitas dan kualitasnya serta berkelanjutan karena tidak dipengaruhi oleh terbatasnya sumber tanaman, musim serta faktor lingkungan kultur yang dapat dikendalikan (Purwianingsih *et al.*, 2018). Kultur kalus merupakan salah satu tipe kultur *in vitro* yang umum digunakan dalam memproduksi metabolit sekunder. Hal ini disebabkan karena kalus memiliki semua informasi genetik pada sel tumbuhan sehingga kalus memiliki kemampuan dalam biosintesis metabolit sekunder pada tanaman target. Produksi metabolit sekunder melalui kalus juga lebih menguntungkan karena tidak membutuhkan waktu yang lama dalam menghasilkan metabolit sekunder tertentu,

tidak dipengaruhi oleh faktor musim serta lebih berkelanjutan produksi metabolitnya dan memudahkan proses ekstraksinya (Efferth, 2019). Namun salah satu kelemahan yang seringkali ditemui dalam produksi metabolit sekunder melalui kultur *in vitro* khususnya adalah metabolit sekunder yang relatif rendah sehingga membutuhkan metode spesifik yaitu elisitasi (Purwianingsih *et al.*, 2018). Elisitasi merupakan salah satu metode yang efektif dalam meningkatkan biosintesis dan akumulasi metabolit sekunder tertentu dalam kultur *in vitro* tanaman. Elisitor yang digunakan dapat berupa molekul biotik maupun abiotik yang dapat menginduksi atau meningkatkan biosintesis senyawa metabolit sekunder spesifik. Efektivitas penggunaan elisitor dalam meningkatkan metabolit sekunder tertentu sangat dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti jenis elisitor, konsentrasi elisitor, waktu elisitasi, usia kultur, tipe kultur (Halder *et al.*, 2019).

Asam salisilat merupakan salah satu elisitor yang banyak dipelajari sebagai sinyal molekul stres untuk menanggapi patogen pada tanaman serta dapat meningkatkan produksi metabolit sekunder tanaman. Penelitian oleh Faizal dan Sari (2019), menunjukkan asam salisilat mampu meningkatkan kandungan saponin hingga 1,3 kali lipat dari kontrol. Asam salisilat dapat meningkatkan produksi saponin dalam kultur akar adventif, namun informasi mengenai penggunaan asam salisilat dalam kultur kalus masih terbatas. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh konsentrasi asam salisilat dan waktu elisitasi terhadap biomassa kalus dan kandungan saponin eksplan daun *Talinum paniculatum*.

## Materi dan Metode

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biologi Dasar Fakultas Bioteknologi Universitas Kristen Duta Wacana (UKDW), Yogyakarta dengan metode eksperimental dengan desain rancangan acak lengkap faktorial untuk menguji interaksi perlakuan konsentrasi asam salisilat dan waktu elisitasi terhadap biomassa kalus dan akumulasi

kandungan saponin kultur kalus eksplan daun *T. paniculatum*. Alat yang digunakan adalah botol kultur, *Laminar Air Flow* (LAF), *Autoclave*, pinset, *scalpel*, *aluminium foil*, pengaduk, timbangan analitik, gelas ukur, pH meter, gelas erlenmeyer, cawan petri, bunsen, kertas label, plat KLT (Kromatografi Lapis Tipis), mikropipet, kompor, kertas saring, *microtube*, dan tabung reaksi. Bahan yang digunakan adalah eksplan daun tanaman Ginseng Jawa (urutan ke-2 atau ke-3 dari bagian pucuk umur 3-4 minggu) yang diperoleh dari Merapi Farma Herbal Kaliurang, media MS (myo-inositol, sukrosa, agar, 2,4-D 2 mg/L dan kinetin 3 mg/L, makronutrien, larutan stok mikronutrient, iron, vitamin) tween, detergen cair, aquades steril, asam salisilat, etanol absolute, 2-Propanol, dan anisaldehyd- $H_2SO_4$ .

#### **Pembuatan Medium *Murashige and Skoog* dan Media Elisitasi**

Pembuatan media MS 1 liter dilakukan dengan mencampurkan bahan makronutrien yang terdiri dari  $NH_4NO_3$  1,65 g/L,  $KNO_3$  1 g/L,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,37 g/L, dan  $KH_2PO_4$  0,17 g/L, lalu ditambahkan larutan stok mikronutrien 1 ml/L, larutan stok iron 5 ml/L, stok vitamin 4 ml/L, Myo-inositol 0,1g/L, ZPT dengan kombinasi 2,4-D 2 ppm dan Kinetin 3 ppm lalu ditambahkan aquades 940 ml. Selanjutnya dilakukan pengukuran derajat keasaman (pH) menggunakan pH meter pada media dengan kisaran 5,7 - 5,8. Media yang telah diatur pHnya kemudian ditambahkan agar dan dipanaskan sampai agar terlarut. Media kemudian dituang ke dalam botol kultur dengan volume media kurang lebih 20 ml lalu ditutup menggunakan *aluminium foil* dan perkamen. Botol kultur yang berisi media MS kemudian disterilkan menggunakan *autoclave* dengan suhu 120°C selama 20 menit dengan tekanan 15 lbs. Setelah proses sterilisasi selesai media disimpan ke dalam ruang kultur.

Pembuatan media elisitor dilakukan sama seperti komposisi dalam media MS lalu ditambahkan asam salisilat sesuai dengan konsentrasi perlakuan yang akan diberikan yaitu 0,5 mM, 0,10 mM, 0,15 mM, 0,20 mM, 0,25 mM, 0,30 mM, 0,35 mM.

#### **Sterilisasi dan Inokulasi Eksplan**

Sebelum dilakukan inokulasi kalus, alat, bahan, dan ruang kerja *laminar air flow* terlebih dahulu disterilisasi. Sterilisasi bahan terbagi dalam dua tahap, pra sterilisasi dan sterilisasi, tahap pra sterilisasi daun *T. paniculatum* dicuci menggunakan air mengalir lalu direndam ke dalam larutan detergen 10% dan 3 tetes tween 80 digojok perlahan selama empat puluh lima detik, dibilas menggunakan aquades sebanyak tiga kali pada bilasan terakhir menggunakan aquades steril sebelum dimasukkan ke dalam petri steril. Tahap sterilisasi dilakukan dalam *Laminari Air Flow* (LAF) dimana eksplan daun *T. paniculatum* dimasukkan ke dalam erlenmeyer steril lalu direndam menggunakan alkohol 50% selama 3 menit, kemudian dibilas menggunakan aquades steril sebanyak tiga kali dan dimasukkan ke dalam cawan petri steril.

Inokulasi eksplan daun ke dalam medium MS dilakukan dengan cara mengambil daun yang telah disterilisasi dengan pinset steril kemudian dipotong dengan ukuran 1 cm x 1 cm dan ditanam ke dalam media dengan bagian abaksial yang kontak dengan media. Bagian mulut botol dipanaskan di atas api bunsen untuk mencegah kontaminasi. Lalu botol kultur ditutup dengan *aluminium foil* dan *plastik wrap* serta diberi label.

#### **Elisitasi**

Elisitasi dilakukan setelah kalus berumur 58 hari atau memasuki fase stasioner (Wijaya *et al.*, 2020). Elisitasi dilakukan dengan memindahkan kalus ke dalam media elisitor dengan konsentrasi asam salisilat 0,5 mM, 0,10 mM, 0,15 mM, 0,20 mM, 0,25 mM, 0,30 mM, 0,35 mM. Kalus diinkubasi selama 3, 6, dan 9 hari. Kalus yang telah diinokulasi lalu dikeringkan menggunakan oven pada suhu 50°C sampai diperoleh berat kering konstan lalu data berat kering digunakan sebagai data biomassa kalus.

#### **Ekstraksi kalus**

Ekstraksi kalus *T. paniculatum* dilakukan berdasarkan modifikasi metode penelitian Manuhara *et al.* (2015). Kalus yang telah dielisitasi, dipanen berdasarkan perlakuan waktu inkubasi kemudian ditimbang untuk mendapatkan berat basah lalu dikeringkan

menggunakan oven pada suhu 50°C sampai diperoleh berat kering yang konstan. Kalus kemudian ditimbang untuk memperoleh berat kering dan dihaluskan menggunakan mortar. Bubuk kalus sebanyak 0,1g diekstraksi menggunakan etanol 96% sebanyak 10 mL kemudian dipanaskan dalam waterbath selama 45 menit dengan suhu 80°C, ekstrak disaring kemudian dipekatkan hingga 0,2 mL menggunakan penangas air 80°C.

#### Identifikasi Saponin menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Identifikasi saponin ekstrak kalus *T. paniculatum* menggunakan KLT dilakukan dengan modifikasi metode yang dilakukan Manuhara *et al.* (2015). Larutan standar yang digunakan adalah standar saponin (Merck) 5% + 1 mL etanol. Plat silika gel GF 254 berukuran 10 x 8 cm dipanaskan kedalam oven dengan suhu 100°C selama 1 jam, lalu 3 µL ekstrak dan standar saponin ditotol menggunakan mikropipet. Kemudian dielusi dengan menggunakan fase gerak 2-propanol : air dengan perbandingan 14 : 3. Untuk penentuan bercak pemisahan pada KLT dilakukan dengan menyemprotkan 0,5 mL, anisaldehyd, 10 mL asam asetat, 85 mL etanol, dan 5 mL asam sulfat kemudian di oven dengan suhu 110°C selama 5-6 menit Noda yang terbentuk diamati di bawah sinar UV 254 nm (Setyani *et al.*, 2016).

#### Hasil

##### Induksi Kalus Ginseng Jawa (*Talinum paniculatum* Gaertn.)

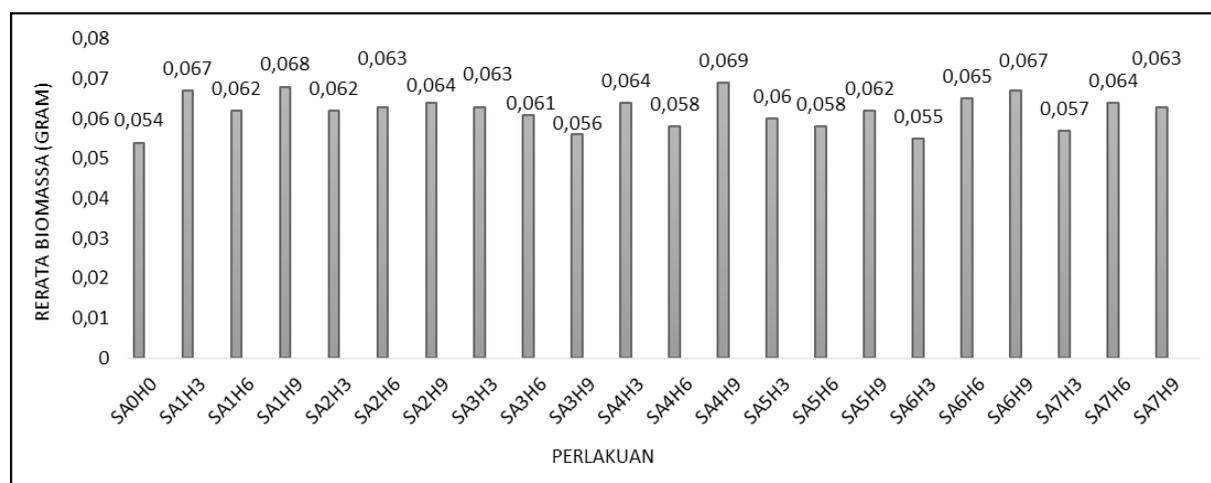
Induksi kalus dilakukan melalui inokulasi eksplan daun *T. paniculatum* ke dalam media MS dengan penambahan ZPT 2 mg/L 2,4-D dan 3 mg/L kinetin. Pengamatan terhadap pertumbuhan kalus dilakukan setiap dua hari sekali. Selanjutnya kalus yang telah memasuki fase stasioner (pada hari ke-58) (Gambar 1.) digunakan dalam elisitasi asam salisilat pada berbagai variasi konsentrasi (0,005–0,35 mM) dan waktu elisitasi (3 – 9 hari).

##### Pengaruh Konsentrasi dan Waktu Elisitasi Asam Salisilat terhadap Biomassa Kalus Ginseng Jawa (*Talinum paniculatum*)

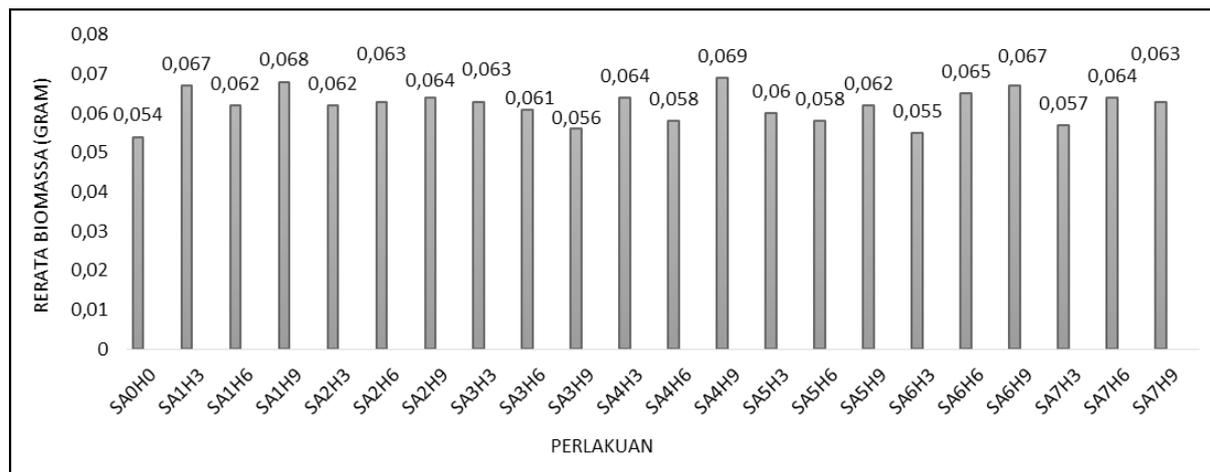
Pengaruh elisitasi terhadap pertumbuhan kalus *T. paniculatum* pada berbagai konsentrasi dan waktu elisitasi ditunjukkan melalui histogram pada Gambar 2.

##### Identifikasi Saponin menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Identifikasi saponin dalam ekstrak kalus eksplan daun ginseng jawa (*Talinum paniculatum*) dilakukan dengan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Identifikasi terhadap saponin secara semi-kuantitatif dilakukan melalui pengukuran luas noda yang terbentuk. Hasil identifikasi saponin dalam ekstrak kalus *T. paniculatum*



Gambar 1. Kalus eksplan daun *Talinum paniculatum* fase stasioner (hari ke-58) pada media MS+ 2mg/L 2,4-D+ 3 mg/L Kinetin



Gambar 2 Diagram biomassa kalus *T. paniculatum*. Keterangan : Konsentrasi asam Salisilat : SA<sub>0</sub> = 0 mM, SA<sub>1</sub> = 0,05 mM, SA<sub>2</sub> = 0,10 mM, SA<sub>3</sub> = 0,15 mM, SA<sub>4</sub> = 0,20 mM, SA<sub>5</sub> = 0,25 mM, SA<sub>6</sub> = 0,30 mM, SA<sub>7</sub> = 0,35 mM. Waktu Inkubasi H<sub>0</sub> = 0 Hari, H<sub>3</sub> = 3 Hari, H<sub>6</sub> = 6 Hari, H<sub>9</sub> = 9 Hari

Tabel 1. Luas Noda Saponin Ekstrak Kalus *T. paniculatum*

Sampel	Rf	Luas Noda Saponin (cm <sup>2</sup> )
Standar Saponin 5%	0,66	0,063
SA <sub>0</sub> H <sub>0</sub>	0,61	0,251
SA <sub>1</sub> H <sub>3</sub>	0,62	0,471
SA <sub>1</sub> H <sub>6</sub>	0,62	0,330
SA <sub>1</sub> H <sub>9</sub>	0,64	0,275
SA <sub>2</sub> H <sub>3</sub>	0,64	0,236
SA <sub>2</sub> H <sub>6</sub>	0,65	0,283
SA <sub>2</sub> H <sub>9</sub>	0,65	0,220
SA <sub>3</sub> H <sub>3</sub>	0,64	0,314
SA <sub>3</sub> H <sub>6</sub>	0,62	0,188
SA <sub>3</sub> H <sub>9</sub>	0,64	0,220
SA <sub>4</sub> H <sub>3</sub>	0,65	0,330
SA <sub>4</sub> H <sub>6</sub>	0,62	0,314
SA <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	0,64	0,283
SA <sub>5</sub> H <sub>3</sub>	0,66	0,424
SA <sub>5</sub> H <sub>6</sub>	0,65	0,275
SA <sub>5</sub> H <sub>9</sub>	0,62	0,283
SA <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	0,64	0,220
SA <sub>6</sub> H <sub>6</sub>	0,64	0,565
SA <sub>6</sub> H <sub>9</sub>	0,65	0,440
SA <sub>7</sub> H <sub>3</sub>	0,64	0,377
SA <sub>7</sub> H <sub>6</sub>	0,65	0,275
SA <sub>7</sub> H <sub>9</sub>	0,64	0,385

menggunakan KLT dapat dilihat pada Gambar 3 dan Tabel 1. Hasil pengamatan menunjukkan adanya bercak hijau setelah disemprot menggunakan anisaldehyde-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> diduga sebagai saponin pada ekstrak kalus *T. paniculatum*. Pembentukan cincin warna hijau menunjukkan adanya saponin (Pratama et al., 2012).

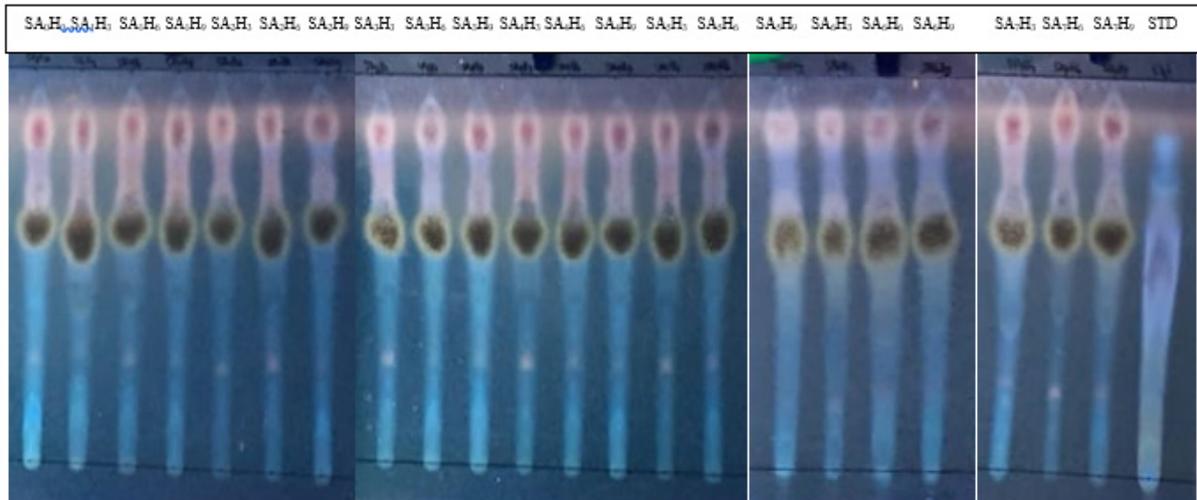
### Pengaruh Konsentrasi dan Waktu Elisitasi Asam Salisilat terhadap Luas Noda Saponin pada Ekstrak Kalus Ginseng Jawa (*Talinum paniculatum*)

Pengaruh elisitasi terhadap biosintesis saponin dalam ekstrak kalus *T. paniculatum* pada berbagai konsentrasi dan waktu elisitasi ditunjukkan melalui histogram pada Gambar 4.

### Pembahasan

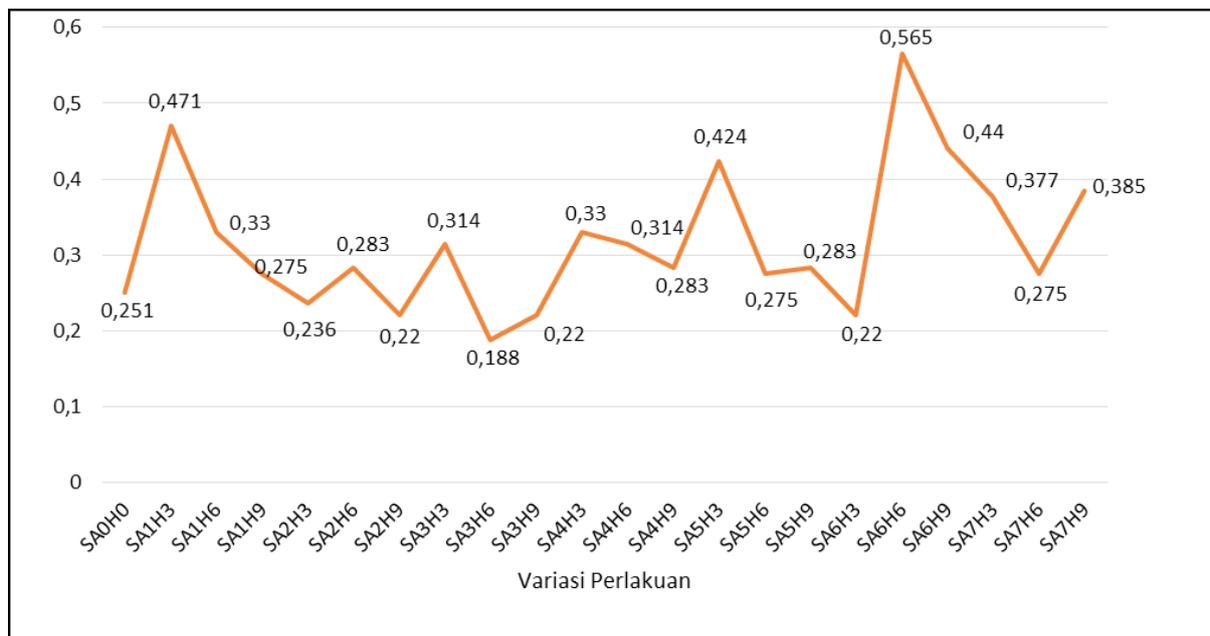
#### Induksi Kalus Ginseng Jawa (*Talinum paniculatum* Gaertn.)

Kalus merupakan kumpulan sel-sel yang belum mengalami diferensiasi dan masih aktif membelah secara terus menerus (Sudarmadji, 2008). Kalus pada umumnya terbentuk sebagai respon terhadap perlakuan pada eksplan saat proses inokulasi. Pertumbuhan kalus selanjutnya merupakan pengaruh dari interaksi antara fitohormon endogen dan ZPT auksin dan sitokinin yang ditambahkan ke dalam media pertumbuhan kultur. Hal ini sesuai dengan kalus yang terbentuk dalam penelitian ini dimana inisiasi pembentukan kalus terjadi pada bekas irisan eksplan karena sebagian sel pada permukaan irisan tersebut mengalami proliferasi. Pengaruh penambahan ZPT 2 mg/L 2,4-D dan 3 mg/L kinetin ke dalam medium MS terbukti dapat menghasilkan kalus yang remah dan berwarna hijau kecoklatan (Gambar 1).



Gambar 3. Identifikasi Saponin menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT).

Keterangan : Konsentrasi asam Salisilat : SA<sub>0</sub> = 0 mM, SA<sub>1</sub> = 0,05 mM, SA<sub>2</sub> = 0,10 mM, SA<sub>3</sub> = 0,15 mM, SA<sub>4</sub> = 0,20 mM, SA<sub>5</sub> = 0,25 mM, SA<sub>6</sub> = 0,30 mM, SA<sub>7</sub> = 0,35 mM. Waktu Inkubasi H<sub>0</sub> = 0 Hari, H<sub>3</sub> = 3 Hari, H<sub>6</sub> = 6 Hari, H<sub>9</sub> = 9 Hari



Gambar 4. Grafik Pengaruh Konsentrasi Asam Salisilat dan Waktu Elisitasi terhadap Luas Noda Saponin pada Ekstrak kalus ginseng Jawa (*Talinum paniculatum*)

Keterangan : Konsentrasi asam Salisilat : SA<sub>0</sub> = 0 mM, SA<sub>1</sub> = 0,05 mM, SA<sub>2</sub> = 0,10 mM, SA<sub>3</sub> = 0,15 mM, SA<sub>4</sub> = 0,20 mM, SA<sub>5</sub> = 0,25 mM, SA<sub>6</sub> = 0,30 mM, SA<sub>7</sub> = 0,35 mM. Waktu Inkubasi H<sub>0</sub> = 0 Hari, H<sub>3</sub> = 3 Hari, H<sub>6</sub> = 6 Hari, H<sub>9</sub> = 9 hari

Pemilihan fase pertumbuhan kalus merupakan salah satu faktor penting yang harus dipertimbangkan dalam melakukan elisitasi. Trimulyono *et al.* (2004), menyatakan bahwa pertumbuhan kalus terbagi menjadi 3 fase yaitu fase lag, eksponensial dan stasioner. Dari ketiga fase tersebut, fase stasioner merupakan fase yang ideal untuk

memulai produksi metabolit sekunder karena sel sudah mulai berhenti membelah dan metabolit primer dapat menjadi precursor metabolisme sekunder. Hal ini sejalan dengan hasil penelitian Wang *et al.* (2015), yang menunjukkan bahwa kalus *H. perforatum* dalam kultur suspensi sel yang memasuki fase stasioner menunjukkan produksi

flavonoid tertinggi sebesar 16 mg/g berat kering kalus dibandingkan pada kalus fase lag dan eksponensial. Berdasarkan hasil penelitian tersebut peningkatan biomassa kalus berkorelasi dengan peningkatan produksi flavonoid dalam kultur suspensi sel yang dielisisasi menggunakan metil jasmonat.

Kalus yang digunakan untuk elisitasi dalam penelitian ini merupakan kalus yang telah memasuki fase stasioner pada hari ke-58 yang merupakan hasil pengamatan penelitian terdahulu (Wijaya *et al.*, 2019). Kalus yang terbentuk bertekstur remah dengan warna hijau kecoklatan (Gambar 1). Warna kecoklatan pada kalus merupakan tanda kalus mengalami penuaan atau sudah masuk fase stasioner (Setiawati *et al.*, 2020). Selain itu, perbedaan warna kalus dapat dipengaruhi oleh pigmentasi, intensitas cahaya, dan sumber eksplan dari bagian tanaman yang berbeda, jaringan kalus yang dihasilkan dari suatu eksplan biasanya memunculkan warna yang berbeda-beda (Lutfiana, 2013). Kalus yang telah masuk fase stasioner (hari ke-58) selanjutnya disubkultur ke dalam media MS yang mengandung asam salisilat variasi konsentrasi 0 mM ; 0,05 mM ; 0,1 mM ; 0,15 mM ; 0,2 mM ; 0,25 mM ; 0,3 mM dan 0,35 mM dan variasi waktu elisitasi (0- 9 hari).

#### ***Pengaruh Konsentrasi dan Waktu Elisitasi Asam Salisilat terhadap Pertumbuhan Kalus Ginseng Jawa (*Talinum paniculatum*)***

Biomassa kalus digunakan untuk dapat mengukur pengaruh elisitasi terhadap pertumbuhan kalus. Pengukuran dilakukan dengan menimbang berat kering kalus. Data yang diperoleh disajikan pada Gambar 2.

Berdasarkan gambar 2 dapat dilihat bahwa biomassa kontrol lebih rendah (0,054 gram) dibandingkan biomassa pemberian perlakuan asam salisilat pada berbagai konsentrasi dan waktu elisitasi (0,056 – 0,069 gram). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian asam salisilat pada berbagai konsentrasi dan waktu inkubasi berpengaruh terhadap peningkatan biomassa kalus *T. paniculatum*. Peningkatan biomassa kalus oleh penambahan asam salisilat tersebut dapat

disebabkan karena asam salisilat merupakan substansi analog hormon yang berperan penting dalam regulasi pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Selain itu, asam salisilat juga terlibat dalam mekanisme pertahanan tumbuhan saat terjadi infeksi patogen dan ketika tanaman mengalami cekaman lingkungan (Anusha *et al.*, 2016).

#### ***Hasil Uji Saponin Kromatografi Lapis Tipis (KLT)***

Hasil pengamatan pada plat KLT dituangkan dalam tabel 2 yang berisikan nilai Rf dan luas noda. Standar yang digunakan pada penelitian ini adalah saponin 5% dalam etanol. Nilai Rf standar saponin adalah 0,66 dan nilai Rf pada kontrol serta perlakuan pemberian asam salisilat nilai Rf berkisar pada 0,61 – 0,66. Hal ini menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan nyata antara nilai Rf standar dan perlakuan, sehingga diduga bahwa noda yang terdapat pada setiap perlakuan merupakan senyawa saponin. Nilai Rf tertinggi terdapat pada konsentrasi asam salisilat 0,25 mM dan waktu inkubasi 3 hari (SA<sub>5</sub>H<sub>3</sub>). Penentuan biosintesis saponin secara semi kuantitatif dilakukan berdasarkan pengukuran luas noda yang terbentuk. Berdasarkan hasil pengamatan pada (Tabel 1 dan Gambar 4.) menunjukkan bahwa luas noda saponin tertinggi adalah pada konsentrasi asam salisilat 0,30 mM dengan waktu inkubasi 6 hari (SA<sub>6</sub>H<sub>6</sub>) sebesar (0,565 cm<sup>2</sup>).

#### ***Pengaruh Konsentrasi dan Waktu Elisitasi Asam Salisilat terhadap Luas Noda Saponin pada Ekstrak Kalus Ginseng Jawa (*Talinum paniculatum*)***

Pemilihan jenis elisitor, konsentrasi elisitor serta waktu elisitasi merupakan faktor-faktor yang harus diperhatikan untuk meningkatkan efektifitas biosintesis metabolit sekunder dalam kultur *in vitro* (Halder *et al.*, 2019). Oleh karena itu dalam penelitian ini dilakukan optimasi terhadap jenis elisitor asam salisilat, variasi konsentrasi asam salisilat (0,05 – 0,3 mM) dan variasi waktu elisitasi (3 – 9 hari) terhadap kandungan saponin dalam kultur kalus *T. paniculatum* pada fase stasioner.

Berdasarkan hasil yang disajikan pada Gambar 4. menunjukkan bahwa pemberian asam salisilat pada berbagai konsentrasi serta waktu elisitasi menghasilkan kandungan saponin (berdasarkan pendekatan luas noda yang terbentuk) yang lebih besar jika dibandingkan dengan kontrol (0,251 cm<sup>2</sup>). Luas noda yang terbesar (0,565 cm<sup>2</sup>) dihasilkan pada kalus yang diberi asam salisilat sebesar 0,3 mM dengan waktu elisitasi selama 6 hari. Berdasarkan hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa pemberian konsentrasi asam salisilat sebesar 0,05 – 0,35 mM pada kultur kalus serta waktu elisitasi selama (3-9 hari) telah mampu memicu stres pada kalus *T. paniculatum* sehingga menstimulasi pembentukan metabolit sekunder sebagai mekanisme pertahanan sel. Hasil penelitian yang sama juga dilaporkan oleh Anusha *et al.* (2016), dimana peningkatan konsentrasi asam salisilat (25 -250 µM) dengan waktu elisitasi (24 – 72 jam) pada kultur suspensi kalus *Celastrus paniculatus* menghasilkan peningkatan produksi total fenol jika dibandingkan dengan kontrol.

### Kesimpulan

Kesimpulan yang diperoleh dalam penelitian ini adalah penambahan konsentrasi asam salisilat sebesar (0,05 – 0,35 mM) dan waktu elisitasi (3-9 hari) pada kultur kalus *T. paniculatum* berpengaruh terhadap peningkatan biomassa kalus (0,056 – 0,069 gram) dibandingkan kontrol (0,054 gram). Selain itu penambahan asam salisilat pada variasi konsentrasi dan waktu elisitasi juga terbukti berpengaruh dalam meningkatkan kandungan saponin dalam kalus dibandingkan kontrol (0,251 cm<sup>2</sup>) yang ditunjukkan melalui luas noda saponin sebesar (0,22 – 0,565 cm<sup>2</sup>). Kandungan saponin tertinggi dihasilkan pada kalus yang diberi asam salisilat konsentrasi 0,3 mM dengan waktu elisitasi selama 6 hari.

### Daftar Pustaka

Anusha, T. S., Joseph, M.V., & Elyas K. K. (2016). Callus Induction and Elicitation in Callus Cell Suspension Culture of *Celastrus paniculatus*-wild, and Endangered Medicinal Plant in India. *Pharmacognosy Journal*, 8(5), 471-475.

- Efferth, T. (2019). Biotechnology Applications of Plant Callus Cultures. *Engineering* (5),50-59.
- Faizal, A. & Sari, A. V. (2019). Enhancement of saponin accumulation in adventitious. *African Journal of Biotechnology*, 18(6), 130-135.
- Halder, M., Sharkar, S., & Jha, S. (2019). Elicitation: A Biotechnological Tool For Enhanced Production Of Secondary Metabolites In Hairy Root Cultures. *Engineering Life Science*, 19(12), 880-895.
- Lutfiana. (2013). Uji Aktivitas Antiinflamasi Eksrtak Daun Kelor (*Moringa oleifera* Lamk.) Dengan Metode Stabilisasi Membrane Sel Darah Merah Dengan Metode *In vitro*. [Skripsi]. Jakarta : UIN Syarif Hidayatullah
- Manuhara, Y. S. W., Kristanti, A. N., & Utami ESW. (2015). Optimization of culture conditions of *Talinum paniculatum* Gaertn. adventitious roots in balloon type bubble bioreactor using aeration rate and initial inoculum density. *Asian Journal of Biological Sciences*, 8, 83-92.
- Pratama, M. A., Hosea J. E., & Jovie M. D. (2012). Isolasi dan Identifikasi Senyawa Saponin Dari Ekstrak Metanol Batang Pisang Ambon (*Musa paradisiaca* var. *sapientum* L.).[online] *Pharmacon*, 1(2), 86-92.
- Purwianingsih, W., Febri, S., & Kusdianti. (2016). Formation flavonoid secondary metabolites in callus culture of *Chrysanthemum cinerariifolium* as alternative provision medicine. AIP Conference Proceedings 1708.
- Setiawati, T., Ayalla, A., Nurzaman, M., Kusumaningtyas, V., & Bari, I. (2020). Analisis Metabolit Sekunder Kultur Pucuk, Kalus, dan Tanaman Lapang *Chrysanthemum morifolium* Ramat. *Jurnal Ilmu Dasar*, 21(1), 1-10.
- Setyani, W., Setyowati, H. & Ayuningtyas, D.(2016). Pemanfaatan Ekstrak Terstandarisasi Daun Som Jawa (*Talinum paniculatum*). *Jurnal Farmasi Sains Dan Komunitas*, 13(1), 44-51.
- Sudarmadji. (2003). Penggunaan Benzil Amino Purine pada Pertumbuhan

- Kalus Kapas Secara In Vitro. Buletin Teknik Pertanian (8).
- Trimulyono, G., Solichatun., & Marliana S. D. (2014). Pertumbuhan Kalus dan Kandungan Minyak Atsiri Nilam (*Pogostemon cablin* (Blanco) Bth.) dengan Perlakuan Asam  $\alpha$ Naftalen Asetat (NAA) dan Kinetin. *Biofarmasi*, 2(1), 9-14.
- Wang, J., Qian, J., Yao, L., & Lu, Y. (2015). Enhanced Production of Flavonoid by Methyl Jasmonate Elicitation in Cell Suspension Culture of *Hypericum perforatum*. *Bioresources dan Bioprocessing* (2)5, 1-9.
- Wijaya. R., Restiani. R., & Aditiyarini. D. (2020). Pengaruh Kitosan terhadap Produksi Saponin Kultur Kalus Daun Ginseng Jawa (*Talinum paniculatum* (Jacq.) Gaertn.). *Prosiding Seminar Nasional Biologi*. 5-1