INDUKSI AKUMULASI BETASIANIN PADA KALUS *Celosia argentea* Linn. DENGAN ELISITOR Co^{2+}

SKRIPSI

oleh:
Rahayu Oktaviani
0610910045-91

JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2011

INDUKSI AKUMULASI BETASIANIN PADA KALUS *Celosia argentea* Linn. DENGAN ELISITOR Co^{2+}

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana
dalam bidang biologi

oleh:
Rahayu Oktaviani
0610910045-91

JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2011

HALAMAN PENGESAHAN SKRIPSI

Induksi Akumulasi Betasianin pada Kalus *Celosia argentea* linn. dengan Elisitor Co^{2+}

oleh:

Rahayu Oktaviani

0610910045-91

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji pada tanggal

6 Juni 2011

dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains dalam bidang Biologi

Pembimbing I	Pembimbing II
Ir. Retno Mastuti MAgr. Sc, DAgr. Sc.	**Dra. Anna Rosdiana MApp.Sc.**
NIP. 19650509-199002-2-001	**NIP. 19580711-199203-2-002**

Mengetahui,

Ketua Jurusan Biologi

Widodo, M.Si., Ph.D, Med.Sc

NIP. 19730811-20003-1 002

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Rahayu Oktaviani
NIM : 0610910045
Jurusan : Biologi
Penulis skripsi berjudul: Induksi Akumulasi Betasianin pada kalus *Celosia argentea* Linn. dengan elisitor Co^{2+}

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. **Isi dari tugas akhir yang saya buat adalah benar-benar karya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi**
2. **Apabila di kemudian hari ternyata Skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.**

Demikian pernyataan ini saya buat dengan segala kesadaran

Malang, 6 Juni 2011
Yang Menyatakan,

(Rahayu Oktaviani)
NIM. 0610910045

PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umu dengan ketentuan bahwa hak cipta pada penulis. Daftar pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipannya hanya dapat dilakukan seijin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.

Induksi Akumulasi Betasianin pada Kalus *Celosia argentea* Linn. dengan Elisitor Co^{2+}

Rahayu oktaviani [(1)], Retno Mastuti [(1)], Anna Roosdiana [(2)]
Jurusan Biologi[(1)] dan Kimia [(2)], Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang.

Abstrak

Betasianin pada tanaman *C. argentea* berpotensi sebagai pewarna alami merah-keunguan yang secara alami disintesis dalam jumlah terbatas. Oleh karena itu apabila akan diproduksi secara komersial diperlukan suatu metode kultur jaringan dengan elisitasi untuk dapat menghasilkan betasianin yang kontinyu. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh konsentrasi elisitor Co^{2+} dan lama kultur terhadap pertumbuhan dan kandungan betasianin kalus *C. argentea*. Penelitian ini menggunakan RAK (Rancangan Acak Kelompok) Faktorial dengan 2 faktor yaitu konsentrasi elisitor Co^{2+} (kontrol, 5, 10, 15, 20 ppm) dan lama kultur (5, 10, 15, 20 hari), ulangan digunakan sebagai kelompok. Warna, berat basah, berat kering dan kadar betasianin kalus diamati pada fase logaritmik (hari ke-5, 10, 15 dan 20). Data dianalisis dengan uji ANOVA, bila ada beda nyata dilanjutkan dengan uji Duncan (tingkat kepercayaan 5%). Kalus merah diinduksi dari kotiledon hasil perkecambahan biji secara *in vitro*. Selanjutnya kalus kontrol dan perlakuan ditimbang berat basahnya, dikeringkan dengan *Freeze drying*, kemudian ditimbang berat keringnya. Selanjutnya kalus diekstraksi (metanol 80%) dan akumulasi betasianin diukur dengan metode spektrofotometri. Kalus yang dihasilkan bersifat kompak, padat, keras dan berwarna merah-keunguan. Konsentrasi elisitor Co^{2+} tidak berpengaruh terhadap berat basah dan berat kering kalus, namun lamanya kultur memberikan pengaruh terhadap berat basah dan berat kering kalus *C. argentea*. Akumulasi betasianin dipengaruhi oleh interaksi antara konsentrasi elisitor dan lama kultur. Elisitasi selama 10 hari dengan konsentrasi Co^{2+} 15 ppm menghasilkan akumulasi betasianin paling tinggi sebesar 498,62 µg/g BK. Elisitor Co^{2+} diduga berperan mengaktivasi enzim pada jalur metabolisme betasianin sehingga pada lama kultur yang sesuai mampu meningkatkan kandungan betasianin.

Kata kunci: Betasianin, *C. argentea* Linn, Elisitor Co^{2+}, Lama Kultur Kalus.

Induction of Accumulation Betacyanin in Callus of *Celosia argentea* Linn. with Elicitor Co^{2+}

Rahayu oktaviani [(1)], Retno Mastuti [(1)], Anna Roosdiana [(2)]
Jurusan Biologi[(1)] dan Kimia [(2)], Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang.

Abstract

Betacyanin in *C. argentea* Linn. has a potential role as purplish red natural colour which is limited in nature. Therefore, in order to produce betacyanin commercially and continously, it needs a method of plant tissue culture with elicitation. The aims of this research were to identify the effect of the different elicitor concentrations and lenght of culture on the callus growth and the accumulation of betacyanin. Design of research was Block Randomize Design Factorial with 2 factors, concentration of Co^{2+} (0, 5, 10, 15, 20 ppm) and lenght of culture (5, 10, 15, 20 days), repetition as a block. Colour, fresh weight, dry weight and betacyanin content of calli were observed at logarithmic phase (at 5,10,15, and 20 days). The data was analyzed by ANOVA and if any differrences Duncan test (significant test 5%) was done. The red calli was induced from cotyledon derived from in vitro germinating seed of *C. argentea* in MS medium + 2 ppm BAP + 2 ppm NAA. Subsequently the fresh calli of control and treatment were weighted and , freeze dried. The dried calli were weighted and extracted using methanol 80%, then the content of betacyanin was measured spectrophotometrically (λ 537 nm). Compact, hard and purplish red calli was derived after one month of culture. The results showed that concentration of elicitor did nort affect fresh and dry weight of calli, but the lenght of culture affected both of them. Accumulation of betacyanin was influenced by interaction between concentration of elicitor Co^{2+} and the lenght of culture. The elicitation for 10 days with elicitor Co^{2+} 15 ppm, yield the highest accumulation of betacyanin (498.62 µg /g DW). The elicitor Co^{2+} properly as activator of enzym therefor effort enhance of betacyanin accumulation in betacyanin pathway. It was assumed that elicitor Co^{2+} activates the enzyme which have a role in the betacyanin metabolic pathway so in the appropriate length of culture can improve the content of betacyanin in *C. argentea* callus.

Key words: betacyanin, *C. argentea* Linn, callus, elicitor Co^{2+}, lenght of culture.

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, segala puji bagi Allah SWT dengan segala rahmat, taufik dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi dengan judul " Induksi Akumulasi Betasianin pada kalus *Celosia argentea* Linn. dengan elisitor Co^{2+}"ini. Penulisan skripsi ini tidak lepas dari bantuan serta bimbingan berbagai pihak, untuk itu penulis mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Ir. Retno Mastuti, M.Agr.Sc.D.Agr.Sc. dan Drs. Anna Roosdiana, M.App.Sc. selaku pembimbing yang telah memberikan bimbingan dan pengarahan penulisan.
2. Dr. Wahyu Widoretno, M.Si.,Drs. Sutrisno M.Si. dan Dr.Ir.Estri Laras A,M.Sc.,St. atas kesediannya sebagai penguji dan memberikan saran serta masukan yang sangat bermanfaat demi penulisan skripsi yang lebih baik.
3. *Student Research Grant* IMHERE atas bantuan dana sehingga penelitian ini dapat terselesaikan dengan lancar.
4. Mbak Wati dan Pak Sugi sebagai laboran Lab. FKM yang telah banyak membantu selama penelitian.
5. Para peneliti di FKM (mbak Ratna, mbak Lilik, mbak Dwi, mbak Ita dan mbak Devi) yang selalu memberikan semangat dan doa.
6. Sahabat-sahabat (Vanica, Tata, Riza, Arum) yang selalu memberikan semangat dan doa.
7. Iswatun Nia,S.Si atas kerja sama dan suka dukanya selama penelitian.
8. Teman-teman "BIOLUMINESCENCE" yang selalu memberikan semangat dan doa.
9. Keluarga tercinta (Bapak, Ibu, kakak-kakak) yang selalu memberikan dukungan, semangat dan doa.
10. Serta semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu.

Penulis sangat menyadari bahwa penulisan skripsi ini belumlah sempurna. Namun, penulis berharap tulisan ini dapat bemanfaat bagi pembaca dan keberlangsungan penelitian yang terkait.

Malang, 6 Juni 2011

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL i
LEMBAR PENGESAHAN iii
LEMBAR PERNYATAAN iv
PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI v
ABSTRAK vi
ABSTRACT vii
KATA PENGANTAR viii
DAFTAR ISI ix
DAFTAR GAMBAR xi
DAFTAR LAMPIRAN xii
DAFTAR TABEL xiii
DAFTAR SINGKATAN xiv

BAB I PENDAHULUAN
1.1 Latar Belakang 1
1.2 Rumusan Masalah 3
1.3 Tujuan Penelitian 3
1.4 Manfaat Penelitian 3

BAB II TINJAUAN PUSTAKA
2.1 *Celosia argentea* Linn 4
2.2 Pigmen Betasianin 5
2.3 Produksi Metabolit Sekunder Secara *In Vitro* dengan Elisitasi 8
2.4 Elisitor Co^{2+} 10

BAB III METODE PENELITIAN
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian 12
3.2 Rancangan Penelitian 12
3.3 Pembuatan medium 12
3.4 Perkecambahan biji sebagai sumber eksplan 13
3.5 Induksi dan Seleksi Kalus 13
3.6 Pembuatan Kurva Pertumbuhan 13
3.7 Elisitasi Kalus 14
3.8 Pengamatan Morfologi dan Pertumbuhan Kalus 14
3.9 Ekstraksi Betasianin 14

3.10Analisis Kadar Betasianin 14
3.11Analisis Data 15

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN
4.1 Pertumbuhan Kalus *C. argentea* Linn 16
4.2 Pengaruh elisitor Co^{2+} dan lama elisitasi terhadap pertumbuhan Kalus *C. argentea* Linn 18
4.3 Pengaruh elisitor Co^{2+} dan lama elisitasi terhadap kandungan betasianin pada kalus *C. argentea* Linn 24

BAB V PENUTUP
5.1 Kesimpulan..... 28
5.2 Saran..... 28

DAFTAR PUSTAKA 29

LAMPIRAN..... 34

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Judul	Halaman
2.1	Tanaman *C. argentea* Linn	4
2.2	Lintasan biosintesis betasianin	6
2.3	Struktur kimia betasianin, betanin, amaranthin, gomphrenin ,2- 2-decarboxy betanin	7
2.4	Mekanisme elisitasi dari Elisitor	10
4.1	Pertumbuhan eksplan kotiledon *C. argentea* Linn. pada medium induksi kalus	17
4.2	Kurva pertumbuhan kalus *C. argentea* Linn. selama 30 hari pada medium induksi kalus	17
4.3	Perubahan warna kalus *C. argentea* Linn. selama Kultur	19
4.4	Pengaruh elisitor Co^{2+} terhadap berat basah dan berat kering kalus *C. argentea* Linn	23
4.5	Pengaruh elisitor Co^{2+} terhadap akumulasi betasianin kalus *C. argentea* Linn	26

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Judul	Halaman
1.	Komposisi medium MS dan pembuatan stok elisitor Co^{2+}	34
2.	Cara penghitungan larutan asam askorbat 50mM dalam 100ml metanol 80%	36
3.	Pertumbuhan kalus dan akumulasi betasianin *C. argentea* Linn	37
4.	Hasil analisis ragam antar subyek	40
5.	Nilai absorbansi betasianin kalus *C. argentea* pada beberapa panjang gelombang	41
6.	Hasil analisis korelasi antar subyek	41

DAFTAR TABEL

Tabel	Judul	Halaman
L.1.1	Standar pengambilan untuk pembuatan medium Murashige-Skoog (MS)	35
L.1.2	Pengambilan larutan stok elisitor Co^{2+}	36
L.3.1	Rata- rata berat basah dan berat kering kalus *Celosia argentea* Linn. kontrol dan dengan penambahan Co^{2+} selama perlakuan	38
L.3.2	Rata- rata akumulasi betasianin pada kalus *Celosia argentea* Linn. kontrol dan penambahan Co^{2+} selama perlakuan	39
L.4.1	Uji ragam antar subyek	40
L.5.1	Nilai absorbansi betasianin kalus *C. argentea* pada beberapa panjang gelombang	41
L.6.1	Uji korelasi antar subyek	42

DAFTAR SINGKATAN

NAA	: *Naphtalentacetic acid*
BAP	: Benzylaminopurine
2,4 D	: 2,4 dichlorophenoxyacetic acid
BK	: berat kering
UV	: *Ultraviolet*
PPO	: *polyphenoloxidase*
MAPK	: *Mitogen activated protein kinase*
ZPT	: Zat Pengatur Tumbuh
MS	: *Murashigae-Skoog*
LAF	: *Laminar Air Flow*

BAB I
PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Warna merupakan hal yang sangat penting pada suatu makanan karena dapat mengindikasikan cita rasa. Penambahan pewarna pada suatu makanan merupakan salah satu cara agar makanan tersebut menjadi lebih menarik. Pewarna yang sering digunakan untuk memberi warna merah adalah jenis pewarna sintetik seperti rodhamin B, yang termasuk ke dalam salah satu zat pewarna berbahaya bagi kesehatan, seperti yang tertulis dalam Peraturan Menteri Kesehatan No. 239/Menkes/Per/V/85 (DEPKES, 1985). Rhodamin B bersifat karsinogenik sehingga mampu mengakibatkan kerusakan fungsi hati dan kanker hati (Listiana, 2010). Warna merah alami dapat dihasilkan dari pigmen tumbuhan salah satunya yaitu betasianin. Berbeda dengan pewarna sintetik, betasianin berpotensi sebagai antioksidan dan antikanker sehingga aman bagi kesehatan (Tesoriere dkk., 2004).

Betasianin merupakan pigmen berwarna merah-keunguan yang pada tumbuhan tingkat tinggi hanya terdapat pada ordo Caryophyllales. Betasianin berpotensi sebagai pewarna alami makanan karena bersifat larut dalam air, stabil pada pH 3-7 dan tidak mudah pudar pada kondisi asam dibandingkan dengan antosianin (Stintzing dan Carle, 2007).

Betasianin pada tanaman utuh diakumulasi pada bunga, buah dan juga pada jaringan vegetatif, sehingga secara alami jumlahnya terbatas, karena keberadaan organ-organ tersebut tergantung pada musim. Oleh karena terbatasnya sumber betasianin sedangkan kebutuhan akan betasianin sebagai pewarna alami semakin meningkat maka dibutuhkan alternatif teknik kultur jaringan yang dapat menghasilkan betasianin secara kontinyu. Produksi metabolit sekunder dapat dilakukan secara *in vitro* melalui teknik kultur jaringan salah satunya dengan kultur kalus. Pada penelitian Mulabagal dan Tsay (2004), kalus *Salvia miltiorrhiza* menghasilkan cryptotanshinone paling optimum sebesar 4,59 ± 0,09 mg/g BK dengan penambahan 0,2 mg/L BA . Kelebihan teknik in vitro dengan kultur kalus adalah tidak tergantung pada iklim dan mempermudah seleksi sesuai karakter yang ditetapkan, misalnya warna kalus (Georgive dkk., 2008).

Produksi betasianin secara komersial selama ini masih terbatas pada *Beta vulgaris* dari famili Chenopodiaceae saja. Famili Amaranthaceae berpotensi sebagai alternatif sumber betasianin salah satunya yaitu dari genus *Celosia* (Cai dkk., 2005). Betasianin pada tanaman *C. argentea* Linn menyebabkan bunganya memiliki warna merah hingga violet. Menurut Schliemann dkk. (2001) pada tanaman *Celosia*, amaranthin merupakan subklas betasianin yang paling dominan.

Produksi metabolit sekunder dapat ditingkatkan melalui kultur kalus dengan cara elisitasi. Metode elisitasi dengan cara kultur kalus banyak digunakan untuk meningkatkan produksi metabolit sekunder. Elisitasi adalah proses penambahan elisitor dalam jumlah sedikit pada sel tumbuhan dengan tujuan untuk menginduksi dan meningkatkan sintesis metabolit sekunder. Elisitor terbagi atas abiotik dan biotik. Elisitor abiotik dapat berupa senyawa anorganik, radiasi ultraviolet, logam berat dan deterjen. Elisitor abiotik berupa logam berat dalam bentuk garam seperti Mn^{2+}, Co^{2+}, Al^{2+}, Pb^{2+}, Cu^{2+}, Fe^{2+}, Mo^{2+}, Zn^{2} sering digunakan untuk elisitasi karena cukup tersedia, mudah digunakan dan murah serta mudah diketahui komponen penyusunnya dibandingkan elisitor biotik (Andrew dkk., 1994). Pada penelitian ini digunakan elisitor abiotik berupa ion logam Co^{2+}, sebab menurut Pan dkk. (2004) penambahan Co^{2+} 2 µM/L dapat meningkatkan kandungan kampotesin pada kultur suspensi *Camptotheca acuminate* sebesar 153% dibandingkan dengan kontrol. Menurut Namdeo (2007), terdapat beberapa faktor yang mempengaruhi elisitasi yaitu konsentrasi elisitor, lamanya pemaparan dengan elisitor, lama kultur dan komposisi nutrisi. Kandungan betasianin meningkat hingga 60% dibandingkan kontrol pada kultur suspensi *Beta vulgaris* setelah penambahan Co^{2+} 5µM yang ditambahkan pada awal kultur (Tapia dkk., 2001).

Produksi betasianin mengalami peningkatan seiring dengan pertumbuhan sel selama fase log. Hal ini berbeda dengan sintesis metabolit sekunder lainnya yang umumnya mulai disintesis pada awal fase stasioner (Akita, 2000). Oleh karena itu maka perlu dilakukan penelitian mengenai pengaruh penambahan elisitor abiotik Co^{2+} dan lama kultur pada kalus *C. argentea* Linn. terhadap akumulasi betasianin sehingga dapat memberikan informasi mengenai alternatif penyediaan sumber pewarna alami yang dapat diproduksi secara kontinyu.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dari penelitian ini adalah:

1. Bagaimana pengaruh konsentrasi elisitor Co^{2+} dan lama kultur terhadap pertumbuhan kalus *C. argentea* Linn ?
2. Bagaimana pengaruh konsentrasi elisitor Co^{2+} dan lama kultur terhadap akumulasi betasianin pada kalus *C. argentea* Linn?

1.3 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Untuk mengetahui pengaruh konsentrasi elisitor Co^{2+} dan lama kultur terhadap pertumbuhan kalus *C. argentea* Linn.
2. Untuk mengetahui pengaruh konsentrasi elisitor Co^{2+} dan lama kultur terhadap akumulasi betasianin pada kalus *C. argentea* Linn.

1.4 Manfaat

Manfaat yang dapat diperoleh dari hasil penelitian diharapkan dapat memberikan alternatif penyedia sumber pewarna alami betasianin secara kontinyu melalui teknik kultur jaringan.

BAB II
TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Celosia argentea* Linn.

Celosia termasuk ke dalam famili Amaranthaceae yang memiliki ciri-ciri berupa terna, duduk daun berhadapan atau menyebar tanpa daun penumpu. Bunga terdapat pada ketiak daun atau tersusun dalam bunga majemuk yang tersusun menyerupai bulir-bulir (Gambar 2.1) (Tjitrosoepomo, 1996). Tanaman *C. argentea* Linn biasa dikenal dengan nama "boroko" yang memiliki tinggi hingga 1,5 m, berbatang tebal dan kuat, bercabang, beralur. Tanaman ini memiliki daun tunggal, bertangkai, dan letaknya berseling, banyak tumbuh di daerah tropis dan tersebar di kawasan subtropik dan beriklim sedang (Yarger, 2007). Buah berwarna merah kehijauan, retak pada saat masak, terdapat dua atau beberapa biji kecil, berwarna hitam. Perbanyakan tanaman ini menggunakan biji (Libnets, 2009).

Gambar 2.1 Tanaman *C. argentea* Linn (Yarger, 2007)

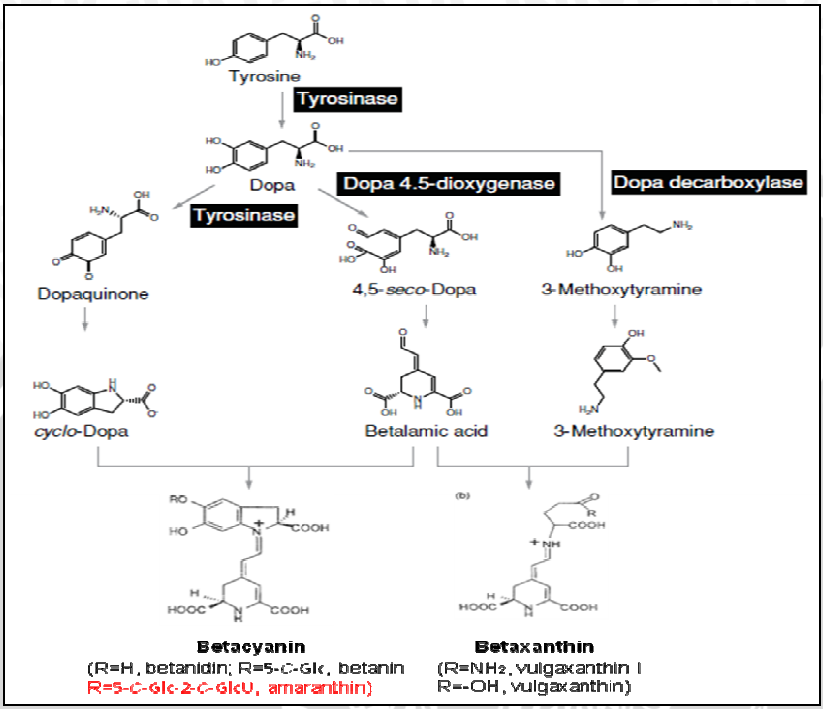
Tanaman *C. argentea* Linn. merupakan salah satu anggota dari famili Amaranthacaea ordo Caryophillales penghasil pigmen betasianin yang terakumulasi pada organ bunga dan tidak mengandung antosianin. Bunga tanaman ini oleh masyarakat pada umumnya digunakan sebagai obat berbagai macam penyakit yaitu: mimisan (epistaksis), batuk darah (hemoptisis), muntah darah (hematemesis), air kemih berdarah (hematuria), wasir berdarah,

perdarahan rahim, disentri, diare, penglihatan kabur, mata merah, infeksi saluran kencing, kencing nanah, dan keputihan (leukorea) (Yarger, 2007).

2.2 Pigmen Betasianin

Betasianin termasuk ke dalam salah satu klas dari pigmen betalain yang berwarna merah-ungu dengan panjang gelombang 535-550nm (IHW, 2003). Betasianin tedapat pada tanaman dari ordo Caryophillales, sub ordo Chenopodiinae, termasuk famili *Amaranthaceae*. Betasianin disintesis dari hasil katalisis tirosin oleh enzim tyrosinase (Gambar 2.2). Enzim tyrosinase mengkonversi tirosin menjadi L-DOPA. Selanjutnya L-DOPA yang mengalami pemecahan ekstradiol pada ikatan 4,5 oleh DOPA dioxigenase membentuk asam betalamat. Enzim tirosinase membantu proses oksidasi L-DOPA menjadi dopaquinon yang selanjutnya menjadi *cyclo*-DOPA (Grotewold, 2006). Kondensasi asam betalamat dengan turunan asam amino melalui ikatan aldimin akan menghasilkan betasantin berwarna kuning dan kondensasi asam betalamat dengan turunan *cyclo*-DOPA akan membentuk betasianin berwarna merah-ungu (Gerritsen, 2000). Reaksi antara asam betalamat dengan asama amino atau dengan *cyclo*-DOPA diduga terjadi secara spontan (Strack dkk., 2003). Betasianin disintesis di dalam sitoplasma dan disimpan di dalam vakuola (Gerritsen, 2000).

Fungsi betasianin pada tanaman adalah untuk memberi warna pada buah dan bunga yaitu untuk menarik polinator dan penyebaran biji yang dibantu oleh hewan serta memberikan perlindungan terhadap bahaya efek sinar UV (Ultraviolet) (Georgiev dkk., 2008). Dalam aplikasinya pigmen betasianin ini umumnya digunakan sebagai pewarna alami pada makanan, obat dan produk kosmetik di dalam bentuk konsentrat atau bubuk (Pavlova dkk., 2002). Betasianin telah diidentifikasi mengandung antioksidan yang dapat mencegah induksi reaktif oksigen serta terjadinya oksidasi antara radikal bebas dengan molekul biologi lainnya sehingga dapat berfungsi sebagai anti kanker (Georgiev dkk., 2008).

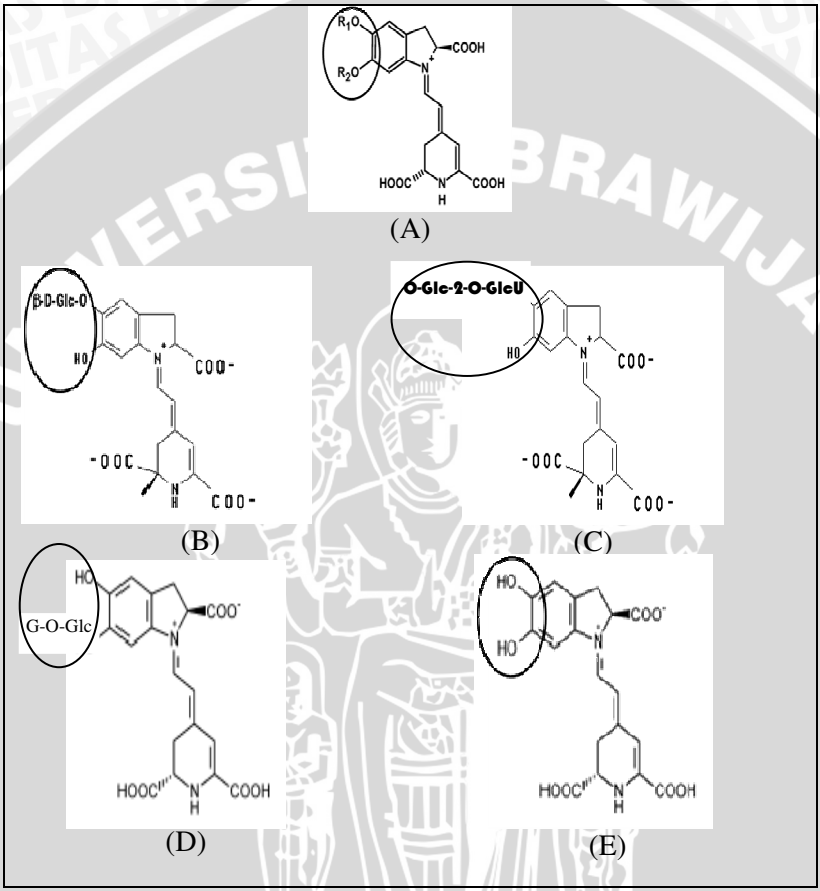


Gambar 2.2 Lintasan biosintesis betasianin.

Betasianin sensitif terhadap suhu, pH, cahaya, udara dan aktivitas air dan stabil pada suhu rendah (≤14°C) ,memiliki pH 5-7 dan paling stabil pada pH 5,6. Ekstrak keringnya sangat stabil pada suhu 25°C dan dapat digunakan setelah 43,5 minggu penyimpanan. Oleh karena itu betasianin sangat berpotensi sebagai pewarna makanan yang komersial (Cai dkk., 2005). Betasianin bersifat lebih hidrofilik dibandingkan dengan antosianin (Stintzing dan Carle, 2007). Ekstraksi betasianin pada umumnya dilakukan dengan cairan metanol sebagai pelarut serta ditambahkan asam askorbat (50 mM) (Cai,dkk.,1998) yang berfungsi menstabilkan pH betasianin dan mengurangi kemungkinan terjadinya oksidasi oleh PPO (*polyphenoloxidase*) (Strack, 2002).

Menurut Akita dkk. (2000) sintesis betasianin terjadi seiring dengan pertumbuhan sel yaitu mulai awal fase log. Hal ini berbeda dengan sintesis metabolit sekunder yang lain yang pada umumnya mulai disintesis pada fase stationer. Pada tanaman C. *argentea* telah teridentifikasi bahwa betasianin yang paling dominan adalah subklas

amaranthin sehingga kandungan amaranthin dapat dianggap sebagai kandungan total betasianin yang diukur secara spektrofotometri (Schliemann dkk., 2001).



Gambar 2.3 Struktur Kimia betasianin (A), betanin (B), amaranthin (C), gomphrenin (D), 2- 2-decarboxy betanin (E).

Betasianin berdasarkan ikatan gugus gula pada R_1 dan R_2 terbagi menjadi empat subklas (Gambar 2.3) yaitu (Strack, 2002):

1. betanin yang banyak dijumpai pada jenis *Beta vulgaris*, apabila gugus R_1 berikatan dengan 5-O-Glc dan R_2 berikatan dengan H (Gambar 2.3B)

2. amaranthin yang dimiliki oleh jenis amaranthaceae diantaranya kelompok *C. argentea*, apabila gugus R_1 berikatan dengan 5-O-Glc-2-O-GlcU dan gugus R_2 berikatan dengan H (Gambar 2.3C)
3. gomphrenin ditemukan pada *Gomphrena globosa*, apabila gugus R_1 berikatan dengan H dan gugus R_2 berikatan dengan G-O-Glc (Gambar 2.3D), serta
4. kelompok 2-decarboxy betanin apabila gugus R_1 dan R_2 sama-sama berikatan dengan H (Gambar 2.3E).

2.3 Produksi Metabolit Sekunder Secara *in vitro* dengan Elisitasi

Kultur jaringan merupakan salah satu teknik yang dapat digunakan untuk meningkatkan substansi bioaktif tanaman, termasuk pigmen. Produksi pigmen sebagai sumber pewarna alami yang dilakukan secara *in vitro* memiliki beberapa kelebihan dibandingkan secara konvensional yaitu kondisi dapat dikontrol. Dalam kultur jaringan terdapat beberapa jenis kultur yang digunakan untuk menghasilkan metabolit sekunder salah satunya adalah kultur kalus (Georgive dkk., 2008).

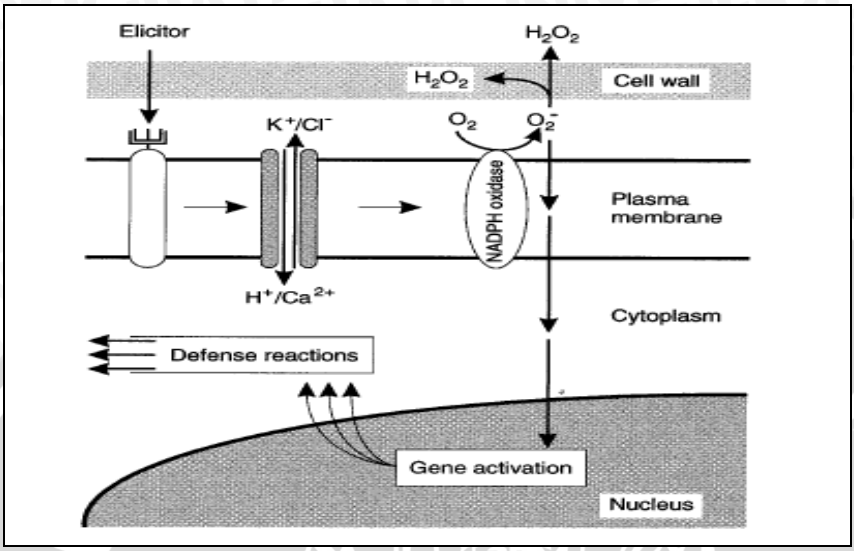
Kalus tersusun atas sel parenkim yang membentuk massa sel amorf yang berasal dari proliferasi jaringan. Penambahan hormon sitokinin dan auksin yang seimbang mampu menginduksi pembentukan kalus (Chawla, 2002). Kalus sebagai sumber senyawa sekunder dan produk lainnya dapat dipacu pembentukan dan pertumbuhannya dengan pemakaian zat pengatur tumbuh 2,4-D, NAA (*Naphtalenaceticacid*) dan sering pula dikombinasikan dengan sitokinin.

Melalui teknik kultur jaringan akumulasi metabolit sekunder dapat lebih ditingkatkan lagi dengan elisitasi. Elisitasi adalah proses penambahan elisitor pada sel tumbuhan dalam jumlah yang sedikit lebih banyak dari kondisi normal pada sel tumbuhan untuk menginduksi atau meningkatkan biosintesis metabolit sekunder (Namdeo, 2007). Mekanisme elisitasi dalam meningkatkan metabolit sekunder mengacu pada mekanisme pertahanan inang terhadap patogennya. Elisitor merupakan substansi yang bila diintroduksikan dengan konsentrasi tertentu pada suatu sistem sel dapat menginisiasi atau meningkatkan biosintesis senyawa tertentu. Kandungan azadirachtin di dalam sel kalus *Azadiracta indica* setelah penambahan elisitor skualen memperlihatkan peningkatan

maksimum sebesar 85,37% bila dibandingkan dengan kandungan azadirachtin tertinggi pada kontrol (0,041 g/g BK) (Zakiah dkk., 2003). Tanaman dapat menghasilkan metabolit sekunder dalam jumlah berlebih sebagai respon pertahanan terhadap stres yang dihasilkan oleh elisitor (Namdeo, 2007). Elisitor terdiri atas elisitor abiotik dan elisitor biotik. Elisitor abiotik dapat berasal dari senyawa anorganik, radiasi secara fisik seperti ultraviolet, logam berat dan deterjen sedangkan elisitor biotik merupakan molekul atau senyawa biologis (Angelova dkk., 2006). Elisitor abiotik dari logam yang biasa digunakan untuk meningkatkan metabolit sekunder secara *in vitro* diantaranya adalah jenis ion logam seperti Cu^{2+}, Mn^{2+}, Fe^{2+}, Mo^{2+}, Zn^{2+}, Co^{2+}.

Pemberian elisitor ion logam pada medium kultur dapat merangsang aktivitas enzim tertentu yang terlibat dalam jalur biosintesis, sehingga mampu meningkatkan produksi metabolit sekunder. Penambahan ion logam Fe^{2+} ke dalam medium sebanyak 5 mg/L dapat meningkatkan aktivitas enzim tirosinase (5%) yang berperan dalam menghasilkan senyawa fenol (Pugh, 1931).

Mekanisme elisitasi diduga melibatkan peran Ca^{2+} yang mempengaruhi permeabilitas membran, aktivasi jalur intraseluler dan perubahan tekanan osmotik akibat stres. Ion Ca^{2+} berperan sebagai *second messenger* terhadap respon dari sinyal lingkungan (Angelova dkk., 2006). Mekanisme umum elisitasi baik oleh elisitor abiotik maupun biotik yaitu diawali dengan pengikatan elisitor oleh reseptor membran plasma karena elisitor memiliki *specific binding site* yang mampu menginduksi perubahan permeabilitas membran plasma (Lila, 2004). Hal tersebut menyebabkan terjadi perubahan flux ion yang melewati membran sel tanaman yaitu masuknya ion Ca^{2+} dan keluarnya ion K^+ dan Cl^-, sehingga terjadi peningkatan pH ekstraseluler serta perubahan fosforilasi protein dan aktivasi protein kinase. Adanya perubahan fosforilasi menyebabkan inaktifasi H^+-ATPase sehingga sitoplasma bersifat lebih asam dan polarisasi membran menjadi menurun. Perubahan fosforilasi protein juga mengaktivasi protein kinase yang selanjutnya menstimulasi MAP-Kinase (*Mitogen activated protein kinase*) untuk mengaktivasi gen (di dalam nukleus) yang berperan dalam biosintesis metabolit sekunder di sitoplasma (Gambar 2.4) (Vasconsuelo dan Boland, 2007).



Gambar 2.4 Mekanisme elisitasi dari elisitor (Jabs dkk., 1997)

2.4 Elisitor Co^{2+}

Elisitor abiotik yang banyak digunakan untuk elisitasi adalah jenis logam,salah satunya yaitu kobalt (Co^{2+}). Kobalt (Co^{2+}) di dalam sel umumnya berupa ion- ion yang banyak berfungsi sebagai katalis reaksi organik. Elisitor Co^{2+} dapat memicu perubahan reaksi dan hasil metabolit sekunder dengan cara memberikan kondisi stres pada sel tanaman (Linden dan Stoner, 2005). Ion Co^{2+} berperan dalam transport ion yaitu keberadaan ion Co^{2+} di sitoplasma akan menyebabkan regulasi pompa efflux dan influx. Selain itu Co^{2+} merupakan komponen dari kobalamin (B_{12}) yang diperlukan untuk aktivitas beberapa enzim (Smits,dkk., 2009).

Di dalam kultur jaringan, ion logam Co^{2+} merupakan komponen mikroelemen yang terdapat di dalam medium kultur yang hanya dibutuhkan dalam jumlah kecil. Namun apabila jumlah ion logam Co^{2+} ini dalam jumlah berlebih, dapat mengakibatkan stres pada sel yang menyebabkan peningkatan produksi metabolit sekunder. Akumulasi Co^{2+} dapat menyebabkan stres pada sel, karena dapat menghambat pengikatan reseptor dengan ligan pada permukaan dinding sel sehingga menyebabkan terhambatnya aktivitas transport ion yang menyebabkan perubahan konsentrasi ion K^+ dan Na^+ (Palit dan Sharma, 1994).

Ion logam Co^{2+} dapat berperan sebagai elisitor yang akan berikatan dengan reseptor pada membran, akibatnya terjadi perubahan aktivitas transport ion dan aktivasi gen-gen pertahanan (gen R) sehingga menghasilkan senyawa-senyawa metabolit sekunder sebagai respon terhadap stres atau cekaman yang ditimbulkan oleh elisitor (Jabs dkk., 1997). Penambahan elisitor Co^{2+} 1 ppm pada medium kultur mampu meningkatkan 16,7% kandungan flavonoid pada kultur kalus tanaman teh (*Camellia sinensis* L.O. Kuntze (Maulidah, 2008). Sedangkan penambahan dengan konsentrasi 5µM mampu meningkatkan produksi betalain hingga 60% pada tanaman *Beta vulgaris* melalui kultur suspensi (Tapia dkk., 2001).

BAB III
METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan mulai bulan November 2009 hingga November 2010. Kultur kalus, ekstraksi dan pengukuran betasianin secara spektrofotometri dilakukan di Laboratorium Fisiologi, Kultur Jaringan dan Mikroteknik Tumbuhan Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, sedangkan *freeze drying* sampel dilakukan di Laboratorium Nutrisi dan Pakan Ternak, Jurusan Peternakan Universitas Brawijaya Malang.

3.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah RAK (Rancangan Acak Kelompok) Faktorial menggunakan 2 faktor yaitu konsentrasi elisitor Co^{2+} terdiri dari 5 taraf yaitu 0 (kontrol), 5, 10, 15, 20 ppm dan lama kultur terdiri dari 4 taraf yaitu 5, 10 ,15 dan 20 hari. Setiap perlakuan dilakukan ulangan 3 kali sebagai kelompok. Parameter yang diamati berupa warna, berat basah dan berat kering kalus serta kadar betasianin pada kalus kontrol dan kalus yang telah dielisitasi dengan Co^{2+}.

3.3 Pembuatan Medium

Medium yang digunakan pada penelitian ini adalah medium perkecambahan, medium induksi kalus, medium seleksi dan medium elisitasi, yang semuanya menggunakan medium dasar MS (Murashige-Skoog). Pembuatan medium semuanya dilakukan langkah yang sama yaitu dengan mencampur larutan stok (Lampiran 1). Medium perkecambahan tanpa penambahan ZPT sedangkan untuk medium induksi kalus, medium seleksi dan medium elisitasi masing-masing ditambahkan ZPT NAA dan BAP 2 ppm dan untuk medium elisitasi juga ditambahkan elisitor Co^{2+} sesuai konsentrasi perlakuan yaitu 5, 10, 15, dan 20 ppm. Setelah semua larutan stok dimasukan ke dalam erlenmeyer. Selanjutnya ditambah gula 30 gram per liter yang dilarutkan dengan aquades dan diaduk dengan stirer hingga larut. Kemudian larutan disesuaikan pada pH sekitar 5,8 dengan penambahan HCl 0,1 N atau KOH 0,1 N. Selanjutnya untuk pembuatan 1 liter medium ditambahkan aquades hingga 1 liter dan agar sebanyak 8 gram per liter kemudian dipanaskan hingga

mendidih. Setelah mendidih medium dimasukkan ke dalam botol kultur yang telah dicuci sebelumnya, ditutup dengan plastik dan dieratkan dengan menggunakan karet. Medium di dalam botol kultur disterilisasi menggunakan autoclav pada suhu 110°C, 1 atm selama 15 menit.

3.4 Perkecambahan Biji sebagai Sumber Eksplan

Dalam penelitian ini digunakan eksplan berupa kotiledon *C. argentea* Linn hasil perkecambahan biji secara *in vitro*. Biji digojok dengan larutan pemutih 50% yang mengandung NaClO 5,25% selama 15 menit. Selanjutnya biji dibilas dengan aquades steril sebanyak 3 kali masing – masing digojok selama 5 menit. Setelah itu biji ditanam pada medium perkecambahan, ~~dan~~ masing–masing botol terdiri atas 5 biji. Tahapan ini dilakukan di dalam *Laminar Air Flow* (LAF). Biji dikecambahkan pada rak kultur dengan intensitas cahaya 35,39 watt/m^2 selama 24 jam per hari pada suhu 25°C.

3.5 Induksi dan Seleksi Kalus

Eksplan kotiledon hasil perkecambahan biji dipotong dan dikultur pada medium induksi kalus di dalam LAF. Selanjutnya diinkubasi pada rak kultur dengan intensitas cahaya 35,39 watt/m^2 selama 24 jam per hari pada suhu 25°C hingga terbentuk kalus. Kalus yang terbentuk disubkultur ke medium seleksi setiap dua minggu sekali dengan cara mengambil kalus yang berwarna merah-keunguan dari botol kultur dan diletakkan di atas cawan petri. Selanjutnya kalus tersebut dipotong – potong kemudian dipilih kalus yang berwarna merah-keunguan dan ditanam kembali ke dalam medium pemeliharaan kalus yang berbeda. Tiap botol medium berisi dua potong kalus dan diinkubasi pada rak kultur dengan intensitas cahaya 35,39 watt/m^2 selama 24 jam per hari pada suhu 25°C.

3.6 Pembuatan Kurva Pertumbuhan

Kalus yang telah terseleksi berwarna merah dengan berat ± 1 gram selanjutnya pertumbuhannya diamati dengan menimbang berat basah kalus setiap 5 hari sekali hingga diperoleh fase stationer. Kurva pertumbuhan dibuat untuk mengetahui fase logaritmik yaitu fase optimal pertumbuhan sel yang diduga juga terjadi biosintesis betasianin secara optimal. Fase logaritmik digunakan sebagai acuan perlakuan lama elisitasi dan waktu pengamatan terhadap

pertumbuhan dan kandungan betasianin kalus.

3.7 Elisitasi Kalus

Kalus yang berwarna merah dengan berat ± 1 gram diinokulasikan pada medium kontrol (0 ppm) maupun medium elisitasi yang telah mengandung elisitor Co^{2+} (5,10,15 dan 20 ppm). Kalus pada medium kontrol dan medium elisitasi tersebut dikultur sampai 5, 10, 15 dan 20 hari yaitu umur kultur yang telah memasuki fase logaritmik (berdasarkan data kurva pertumbuhan kalus pada sub bab 3.4).

3.8 Pengamatan Morfologi dan Pertumbuhan Kalus

Pengamatan morfologi kalus dilakukan secara deskriptif terhadap perubahan warna kalus. Sedangkan pengamatan terhadap pertumbuhan kalus dilakukan dengan menimbang berat basah dan berat kering kalus kontrol dan kalus perlakuan. Semua kegiatan ini dilakukan pada umur kultur 5, 10, 15 dan 20 hari.

3.9 Ekstraksi Betasianin

Untuk mengetahui pengaruh pemberian variasi konsentrasi elisitor Co^{2+} terhadap produksi betasianin selama variasi lama kultur maka dilakukan ekstraksi pada kalus kontrol dan perlakuan yang mengacu pada penelitian Cai, dkk. (1998). Kalus pada umur kultur sesuai perlakuan dikeringkan dahulu dengan cara *freeze drying* lalu digerus dan ditambahkan 10 ml Metanol 80% yang telah ditambahkan 50 mM asam askorbat (Lampiran 2). Hasil penggerusan berupa homogenat selanjutnya dilakukan sentrifugasi pada kecepatan 2500 rpm selama 10 menit. Supernatan yang diperoleh merupakan hasil ekstraksi yang akan diukur absorbansinya secara spektrofotmetri.

3.10 Analisis Kadar Betasianin

Kuantifikasi betasianin kalus *C. argentea* dilakukan dengan cara spektrofotometri melalui pengukuran absorbansi supernatan. Supernatan diukur nilai absorbansinya pada panjang gelombang 537 nm, karena panjang gelombang tersebut memberikan nilai absorbansi pigmen batasianin paling besar berdasarkan rentang panjang gelombang betasianin pada kalus *C. argentea* (Lampiran 5,Tabel L 5.1). Kadar betasianin pada kalus diukur sebagai amaranthin yang

merupakan salah satu subklas betasianin yang telah teridentifikasi paling dominan pada *Celosia* (Schliemann dkk., 2001). Metode ini mengacu pada penelitian Cai, dkk. (1998) menggunakan rumus Beer- Lambert:

$$SC = \frac{AxMWxVx\ DF}{\varepsilon \times l \times Wd}$$

Keterangan :

A	: Absorbansi yang diperoleh pada λ 537 nm
ε	: Koefisien ekstensi molar λ 537 nm (5,66 x 10^4 L/mol)
MW	: Berat molekul amaranthin (726,6 µg/mol)
SC	: Konsentrasi yang diperoleh (mg/g)
l	: tebal kuvet yang digunakan (1 cm)
V	: volume pelarut (ml)
Wd	: berat kering kalus (g)
DF	: faktor pengenceran

3.11 Analisis Data

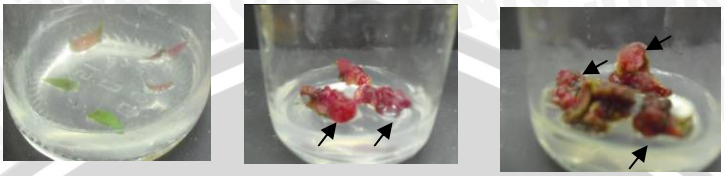
Data yang diperoleh dari hasil penelitian berupa berat kering, berat basah dan kandungan betasianin selanjutnya dianalisis secara statistik menggunakan uji ANOVA dan dilanjutkan uji Duncan dengan tingkat kepercayaan 5%.

BAB IV
HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pertumbuhan Kalus *C. argentea* Linn.

Respon eksplan kotiledon *C. argentea* yang ditumbuhkan pada medium induksi (Gambar 4.1A), diawali dengan menggembungnya eksplan berumur 1-2 minggu (Gambar 4.1B). Selanjutnya akan muncul kalus berupa tonjolan-tonjolan kecil pada bagian eksplan yang terluka akibat pemotongan. Tonjolan-tonjolan kalus yang muncul tersebut semakin banyak menyebar ke seluruh bagian permukaan eksplan dan akan terus membesar (Gambar 4.1C). Namun tidak semua jaringan membentuk kalus dan masih ada jaringan yang belum membentuk kalus sehingga diperlukan subkultur. Subkultur juga berfungsi sebagai seleksi kalus yang berwarna merah-keunguan. Subkultur yang dilakukan setiap 2 minggu sekali menghasilkan kalus kompak dengan tekstur padat, keras dan berwarna merah - keunguan.

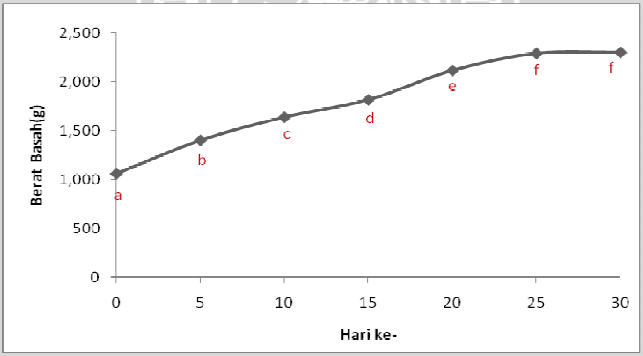
Pertumbuhan kalus dipengaruhi oleh beberapa faktor, salah satunya yaitu penambahan Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) ke dalam medium seperti auksin dan sitokinin. Penambahan ZPT ke dalam medium dengan konsentrasi yang sesuai akan memicu peningkatan pembentukan kalus pada daerah yang terluka. Berdasarkan penelitian pendahuluan penggunaan medium MS (*Murashigae-Skoog*) dengan NAA dan BAP dengan masing-masing konsentrasi 2 ppm menghasilkan kalus paling baik. NAA (*Naphthalene acetic acid*) merupakan salah satu jenis auksin sintetik yang berfungsi untuk pemanjangan sel, sedangkan BAP (*Benzylaminopurine*) merupakan salah satu jenis sitokinin sintetik yang berfungsi untuk pembelahan sel. Menurut Syahid (2010) penambahan sitokinin dan auksin ke dalam media dapat merangsang pertumbuhan kalus karena kedua zat pengatur tumbuh tersebut bekerja secara sinergis. Adanya sitokinin dapat meningkatkan pembelahan sel dalam proses sitokinesis dan bersama-sama auksin akan membentuk kalus.



A B C

Gambar 4.1.Pertumbuhan eksplan kotiledon *C. argentea* Linn. pada medium induksi kalus. (A) eksplan kotiledon yang baru dikultur pada medium induksi, (B) eksplan menggembung umur 2 minggu, (C) kalus yang terbentuk pada eksplan umur minggu (ditunjukkan dengan tanda panah).

Kurva pertumbuhan pada setiap jenis kultur dengan eksplan yang berbeda memiliki pola pertumbuhan yang berbeda. Menurut Smith (2000) pada umumnya kurva pertumbuhan tanaman berbentuk sigmoid yang terdiri atas fase lag, fase eksponensial dan fase stationer. Berdasarkan kurva pertumbuhan kalus *C. argentea* Linn. selama 30 hari kultur, berat basah kalus terus mengalami peningkatan berat basah secara signifikan dari hari ke-0 (1,063 g) hingga hari ke-25 (2,292 g) (Gambar 4.2). Selanjutnya penambahan berat basah kalus tidak berbeda signifikan pada hari ke-30 (2,302 g).



Gambar 4.2 Kurva pertumbuhan kalus *C. argentea* Linn. selama 30 hari pada medium induksi kalus. Ket. Huruf yang sama menunjukkan tidak ada beda nyata pada uji duncan dengan tingkat kepercayaan 5% dan menunjukkan fase stationer.

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa fase lag tidak tampak, sebab pada awal kultur berat basah kalus sudah mengalami peningkatan signifikan yaitu dari 1,042 g dari hari ke-0 menjadi 1,405 g pada hari ke-5. Menurut Stafford dan Warren (1991) fase lag merupakan fase persiapan untuk pembelahan sehingga aktivitas pembelahan sel terjadi secara perlahan karena masih dalam proses adaptasi. Diduga fase lag kalus *C. argentea* terjadi secara singkat antara selang hari ke-0 hingga hari ke-5 kultur.

Selanjutnya fase logaritmik kalus *C. argentea* diduga terjadi pada hari ke-5 hingga hari ke-25 yang ditunjukkan dengan peningkatan berat basah kalus yang signifikan pada tiap-tiap selang lama kultur mulai hari ke-5 hingga hari ke-25 masing-masing sebesar 0,235g, 0,178g, 0,299g dan 0,175g. Fase logaritmik terjadi akibat adanya pembelahan sel yang maksimal yang ditandai dengan peningkatan berat basah secara signifikan. Sedangkan pada hari ke-30 kalus mengalami fase stationer awal sebab peningkatan berat basah kalus tidak signifikan (0,01 g). Menurut Silva dkk. (2004) fase logaritmik merupakan fase dimana terjadi pembelahan seluler maksimal dengan laju pertumbuhan tertinggi. Selanjutnya fase logaritmik akan diikuti dengan fase stationer yaitu terjadinya penurunan laju pertumbuhan sel akibat berkurangnya jumlah nutrisi di dalam medium setelah digunakan sel untuk pembelahan maksimal.

Menurut Akita (2000) dan Hirose (1990) sintesis betasianin optimum terjadi selama fase logaritmik. Hal inilah yang membedakan sintesis betasianin dengan sintesis metabolit sekunder lainnya yang pada umumnya mulai disintesis pada awal fase stationer. Berdasarkan hal tersebut, untuk mengetahui akumulasi betasianin optimum maka perlakuan lama kultur mengacu pada fase logaritmik pertumbuhan kalus *C. argentea* Linn. yaitu dimulai pada hari ke-5 hingga hari-20.

4.2 Pengaruh Elisitor Co^{2+} dan Lama Kultur terhadap Pertumbuhan Kalus *C. argentea* Linn.

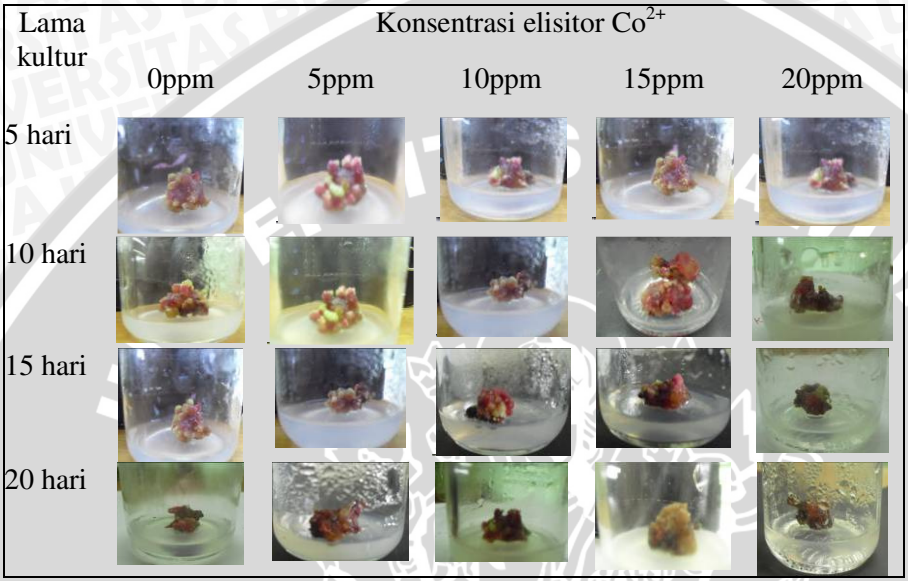
Kalus mengalami perubahan warna pada semua perlakuan konsentrasi elisitor seiring lamanya kultur (Gambar 4.3). Pada kalus kontrol (0 ppm) perubahan warna merah-keunguan yang memudar menjadi sedikit kekuningan dan muncul kecoklatan mulai terjadi pada lama kultur 20 hari, sedangkan kalus perlakuan dengan

konsentrasi elisitor Co^{2+} 5 ppm warna merah-keunguan memudar dan muncul warna kecoklatan pada lama kultur 15 hari. Hal ini juga terjadi pada kalus perlakuan elisitor Co^{2+} 15 dan 20 ppm yang menunjukkan warna merah-keunguan memudar pada lama kultur 15 hari dan menjadi didominasi oleh warna coklat. Sedangkan pada perlakuan elisitor Co^{2+} 10 ppm warna kalus terlihat lebih merah pada lama elisitasi 15 hari selanjutnya warna merahnya memudar dan menjadi berwarna coklat pada lama elisitasi 20 hari. Warna kalus mengalami perbedaan perubahan percepatan yaitu semakin tinggi konsentrasi elisitor Co^{2+} yang diberikan menyebakan warna merah-keunguan kalus semakin cepat memudar dan semakin cepat berubah menjadi kecoklatan. Hal ini menunjukkan bahwa elisitor Co^{2+} mempengaruhi intensitas warna merah-keunguan pada kalus dan menyebabkan pencoklatan (*browning*).

Selain itu lama kultur juga mempengaruhi intensitas warna merah-keunguan pada kalus. Hal ini terlihat pada lama kultur 20 hari, semua kalus baik kontrol maupun perlakuan menghasilkan warna merah-keunguan yang sangat sedikit dan banyak didominasi oleh warna coklat dan kuning. Namun berbeda dengan warna kalus pada lama kultur 5, 10 dan 15 hari yang menunjukkan intensitas warna merah-keunguan relatif masih tinggi bila dibandingkan dengan lama kultur 20 hari baik pada kontrol maupun kalus perlakuan. Berdasarkan pengamatan morfologi tersebut dapat disimpulkan bahwa semakin tinggi konsentrasi elisitor Co^{2+} yang diberikan seiring dengan semakin lamanya kultur menyebabkan intensitas warna merah kalus semakin berkurang dan muncul warna kecoklatan.

Perubahan warna kalus menjadi coklat diduga karena adanya sintesis senyawa fenolik yang disintesis oleh sel pada semua jenis tumbuhan. Menurut Fitriani (2003) sel tumbuhan akan menghasilkan senyawa fenol sebagai mekanisme pertahanan akibat adanya stress atau cekaman meskipun terdapat beberapa jenis tumbuhan yang memang menghasilkan senyawa fenolik tanpa adanya stres. Elisitasi dapat pula menyebabkan akumulasi senyawa fenolik yang semakin meningkat seiring lama kultur dan konsentrasi elisitor yang diberikan sehingga dapat mengakibatkan pencoklatan (*browning*) akibat teroksidasinya senyawa fenol dengan oksigen dan dengan bantuan enzim polifenoloksidase akan menghasilkan warna coklat (*browning*) (Sudirga dkk., 2004). Sintesis senyawa fenol yang dihasilkan kalus

C. argentea Linn. dengan munculnya warna coklat pada kalus mengindikasikan bahwa sel-sel kalus mengalami stres atau cekaman akibat adanya penambahan elisitor Co^{2+} selama elisitasi.



Gambar 4.3 Warna kalus *C. argentea* Linn. selama kultur.

Selain akibat dari perlakuan elisitasi, warna coklat juga diduga akibat dari sel-sel kalus yang tua, terlihat dari warna kalus kontrol yang menunjukkan warna coklat semakin dominan hingga 20 hari kultur. Semakin lama kultur menyebabkan nutrisi yang terkandung di dalam medium semakin berkurang sebab telah digunakan untuk pertumbuhan optimal sel. Menurut Narayanaswamy (1994) pencoklatan dapat terjadi akibat adanya jaringan atau kumpulan sel yang tua dan tidak dapat membelah lagi akibat menipisnya nutrisi yang menyebabkan kematian sel.

Berdasarkan uji ragam, penambahan elisitor Co^{2+} dengan konsentrasi berbeda pada medium tidak mempengaruhi pertumbuhan kalus (Lampiran 4, Tabel L 4.1). Namun demikian, masing-masing konsentrasi elisitor yang ditambahkan cenderung dapat menghasilkan berat basah kalus paling tinggi pada lama kultur yang berbeda (Gambar 4.4 A). Kalus kontrol cenderung menghasilkan berat basah paling tinggi bila dikultur selama 15 hari. Konsentrasi elisitor 5 ppm cenderung menghasilkan berat basah kalus paling tinggi pada lama

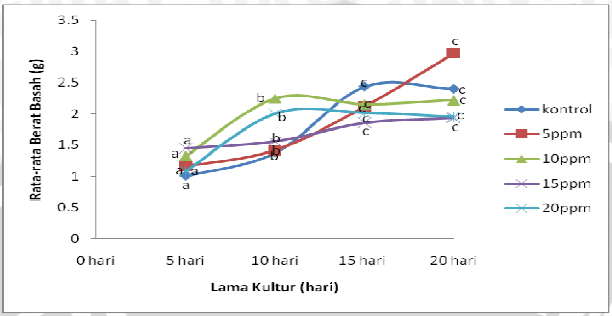
elisitasi 20 hari sedangkan konsentrasi 10 ppm cenderung menghasilkan berat basah kalus paling tinggi bila dielisitasi selama 10 hari. Konsentrasi elisitor 15 ppm cenderung menghasilkan berat basah kalus paling tinggi hanya pada lama kultur 5 hari dan bila dielisitasi lebih dari 5 hari akan menghasilkan berat basah kalus yang cenderung lebih rendah dibanding kontrol dan konsentrasi elisitor lain. Pada kalus dengan perlakuan elisitor 20 ppm menghasilkan berat basah cenderung tinggi pada lama elisitasi 10 hari, meskipun masih cenderung lebih rendah daripada berat basah kalus dengan elisitor 10 ppm.

Terlihat bahwa konsentrasi elisitor paling rendah (5 ppm) cenderung menghasilkan berat basah kalus paling tinggi apabila dielisitasi dalam waktu lama (20 hari). Sedangkan konsentrasi elisitor yang lebih tinggi yaitu 10 dan 15 ppm cenderung menghasilkan berat basah kalus paling tinggi apabila dielisitasi masing-masing dalam waktu 5 dan 10 hari. Hal ini menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi elisitor akan menghasilkan berat basah kalus cenderung lebih tinggi bila dielisitasi dalam waktu yang lebih singkat. Sebaliknya konsentrasi elisitor yang rendah untuk bisa menghasilkan berat basah kalus yang tinggi perlu dielisitasi dalam waktu yang lebih lama. Diduga penambahan elisitor dengan konsentrasi rendah dibawah 5 ppm masih digunakan oleh sel-sel kalus untuk menghasilkan metabolisme primer hingga lama kultur 15 hari, sedangkan penambahan elisitor dengan konsentrasi diatas 5 ppm mampu menghambat pertumbuhan sel dalam waktu singkat kurang dari 15 hari. Menurut Zhao dkk. (2010) penambahan elisitor dapat mengakibatkan pertumbuhan sel terhambat sebagai respon pertahanan akibat adanya stres.

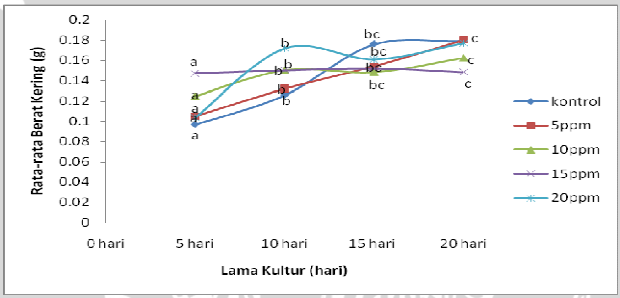
Berdasarkan uji ragam berat basah kalus dipengaruhi oleh lama kultur (Lampiran 4, Tabel L 4.1, Gambar 4.4 A). Pada kalus kontrol dan kalus perlakuan elisitor Co^{2+} konsentrasi 5 dan 15 ppm berat basahnya meningkat signifikan dimulai dari lama kultur 5 hari (masing-masing 1,011 g, 1,167 g dan 1,451 g) hingga 15 hari (masing-masing 2,432 g, 2,22 g dan 1,858 g), namun berat basah kalus pada lama kultur 15 hari tidak berbeda signifikan dengan lama kultur 20 hari. Pada lama kultur 20 hari berat basah kalus akibat penambahan elisitor 5 ppm cenderung lebih tinggi dibanding penambahan elisitor 15 ppm. Berat basah pada kalus kontrol (0 ppm) meningkat signifikan hingga lama kultur 15 hari (2,437 g), kemudian

cenderung menurun pada lama kultur 20 hari (2,411 g). Kalus dengan perlakuan konsentrasi elisitor Co^{2+} 5 dan 15 ppm walaupun menghasilkan berat basah kalus yang sama-sama meningkat signifikan hingga lama kultur 15 hari (2,22g dan 1,858 g) namun pada lama kultur 20 hari peningkatan berat basah kalus akibat penambahan elisitor 5 ppm cenderung lebih tinggi. Sedangkan untuk perlakuan dengan konsentrasi elisitor Co^{2+} 10 dan 20 ppm, berat basah kalus meningkat signifikan hingga lama kultur 10 hari (2,244 g dan 2,007 g) kemudian menurun signifikan bila dikultur selama 15 hari.

Tidak berbeda dengan berat basah kalus, berat kering kalus juga tidak dipengaruhi oleh konsentrasi elisitor Co^{2+} (Lampiran 4, Tabel L 4.1). Kalus kontrol dan perlakuan menghasilkan berat kering yang cenderung berbeda pada tiap-tiap lama kultur yang diujikan (Gambar 4.4 B). Kalus kontrol menghasilkan berat kering cenderung paling rendah pada lama kultur 5 hari namun cenderung menghasilkan berat kering kalus paling tinggi pada lama kultur 15 hari. Sedangkan pada perlakuan elisitor Co^{2+} 5 ppm menghasilkan berat kering kalus yang cenderung lebih tinggi pada lama kultur 20 hari. Pada konsentrasi 10 ppm berat kering kalus cenderung paling rendah dihasilkan pada lama kultur 15 hari dibandingkan kontrol dan konsentrasi yang lain. Pada konsentrasi 15 ppm menghasilkan berat kering kalus cenderung paling tinggi pada lama kultur 5 hari namun pada lama kultur 20 hari menghasilkan berat kering kalus cenderung paling rendah. Sedangkan pada konsentrasi 20 ppm berat kering kalus cenderung paling tinggi dihasilkan pada lama kultur 10 hari. Pemberian konsentrasi elisitor yang rendah cenderung menghasilkan berat kering kalus lebih rendah pada lama kultur yang lebih lama.



(A)



(B)

Gambar 4.4 Pengaruh elisitor Co^{2+} terhadap berat basah (A) dan berat kering (B) kalus *C. argentea* Linn. Ket. Huruf kecil yang sama pada lama kultur yang berbeda dan pada setiap konsentrasi elisitor Co^{2+} yang sama menunjukkan tidak ada beda nyata berdasarkan uji duncan dengan tingkat kepercayaan 5%.

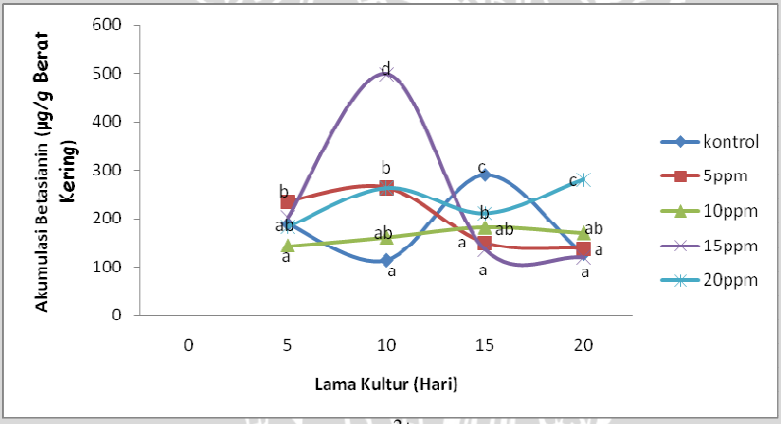
Lamanya kultur mempengaruhi berat kering kalus yang dihasilkan (Lampiran 4, Tabel L 4.1, Gambar 4.4 B). Berat kering kalus kontrol maupun perlakuan elisitor pada lama kultur 5 hari berbeda signifikan dengan berat kering kalus pada lama kultur 10,15 dan 20 hari, meskipun pada lama kultur 15 hari tidak berbeda signifikan dengan berat kering pada lama kultur 10 dan 20 hari. Berat kering kalus kontrol maupun perlakuan elisitor pada lama kultur 10 hari berbeda signifikan dengan berat kering kalus pada lama kultur 5 dan 20 hari, namun tidak berbeda signifikan dengan berat kering kalus pada lama

kultur 15 hari. Pada konsentrasi elisitor Co^{2+} 5 ppm berat kering kalus terus meningkat signifikan bila dielisitasi hingga 20 hari (0,18 g). Pada konsentrasi elisitor Co^{2+} 10 dan 20 ppm, berat kering kalus cenderung menurun pada lama kultur 15 hari (0,148 g dan 0,151 g). Sedangkan pada konsentrasi elisitor Co^{2+} 15 ppm berat kering kalus terlihat cenderung stabil hingga lama kultur 20 hari (0,148 g) meskipun masih cenderung lebih rendah dari berat kering kalus kontrol (0,179 g). Penambahan elisitor Co^{2+} dengan konsentrasi 5 ppm yang cenderung meningkatkan berat kering kalus diduga karena pada konsentrasi elisitor Co^{2+} 5 ppm masih belum dapat menimbulkan stres pada sel kalus dan masih digunakan sel-sel kalus untuk pertumbuhan. Sedangkan pemberian konsentrasi elisitor diatas 5 ppm cenderung menurunkan berat kering kalus, diduga karena elisitor Co^{2+} pada konsentrasi diatas 5 ppm telah menyebabkan sel-sel kalus menjadi stres sehingga menurunkan tingkat aktivitas metabolit primernya dan menghasilkan metabolit sekunder. Menurut Vasconsuelo dan Boland (2007), elisitor dapat menurunkan sintesis metabolit primer dan mengaktifkan sintesis metabolit sekunder sebagai bentuk pertahanan terhadap adanya stres. Hal ini sesuai dengan penelitian Maulidah (2008) bahwa penambahan konsentrasi elisitor Co^{2+} 10 ppm dapat menyebabkan penurunan berat basah dan berat kering kalus teh (*Camellia sinensis* L.O.Kuntze) selama 4 minggu kultur.

4.3 Pengaruh Elisitor Co^{2+} dan Lama Kultur terhadap Akumulasi Betasianin pada Kalus *C. argentea* Linn.

Konsentrasi elisitor Co^{2+} dan lama kultur berpengaruh pada kandungan betasianin kalus *C. argentea*. Lama kultur berinteraksi dengan konsentrasi Co^{2+} dalam mempengaruhi akumulasi betasianin pada kalus *C. argentea* (Lampiran 4, Tabel L.4.1, Gambar 4.5). Peningkatan konsentrasi elisitor Co^{2+} dengan pemberian lama kultur yang berbeda menghasilkan kandungan betasianin yang fluktuatif berkisar antara 121,24 µg/g BK hingga 498,62 µg/g BK. Perlakuan elisitasi dengan konsentrasi elisitor Co^{2+} 15 ppm selama 10 hari menghasilkan akumulasi betasianin yang signifikan paling tinggi (498,62 µg/g BK) dibandingkan kontrol dan konsentrasi yang lain, namun apabila dielisitasi dengan elisitor Co^{2+} 10 ppm dengan semua lama kultur yang diujikan akan menghasilkan akumulasi betasianin yang relatif rendah. Pada kalus kontrol dengan lama kultur 15 hari

dan kalus yang dielisitasi elisitor Co^{2+} 20 ppm selama 20 hari, masing-masing menghasilkan akumulasi betasianin yang signifikan lebih tinggi dibandingkan interaksi perlakuan lain, yaitu 290.40 µg/g BK dan 280.62 µg/g BK. Walaupun lebih rendah secara signifikan dibanding dengan perlakuan elisitasi dengan elisitor Co^{2+} 15 ppm selama 10 hari. Untuk perlakuan elisitasi dengan elisitor Co^{2+} 5ppm selama 5 dan 10 hari serta konsentrasi elisitor Co^{2+} 20 ppm selama 10 dan 15 hari, menghasilkan akumulasi betasianin yang tidak berbeda nyata. Kalus kontrol dan perlakuan elisitor Co^{2+} dengan konsentrasi diatas 15 ppm akan menghasilkan akumulasi betasianin yang tidak berbeda signifikan, bila dikultur masing-masing selama 5 hari, namun penambahan elisitor Co^{2+} 5 dan 15 ppm dapat menghasilkan akumulasi betasianin yang relatif rendah bila dikultur dalam waktu lebih dari 15 hari. Begitu pula dengan kalus kontrol yang dikultur selama 10 dan 20 hari, menghasilkan akumulasi betasianin yang tidak berbeda signifikan dengan konsentrasi 5 dan 15 ppm yang dikultur selama lebih dari 15 hari.



Gambar 4.5. Pengaruh elisitor Co^{2+} terhadap akumulasi betasianin kalus *C. argentea* Linn. Ket. Huruf kecil yang sama pada setiap interaksi lama kultur dan konsentrasi elisitor menunjukkan tidak ada beda nyata berdasarkan uji duncan dengan tingkat kepercayaan 5% .

Akumulasi optimum betasianin (498,62 µg /g BK) diperoleh dari kalus *C.argentea* dengan penambahan elisitor Co^{2+} 15 ppm selama kultur 10 hari (Gambar 4.5). Hal ini diduga bahwa pada pemberian

konsentrasi elisitor 15 ppm dengan lama kultur 10 hari merupakan kombinasi atau interaksi yang paling sesuai untuk meningkatkan aktivitas enzim yang berperan dalam jalur metabolisme betasianin pada kalus *C. argentea*. Menurut Huang dkk. (1995) *dalam* Tapia dkk. (2001) penambahan Co^{2+} 2,5 μM menstimulasi sintesis L-DOPA 25 kali lebih banyak dibandingkan dengan kontrol pada kultur suspensi tanaman *Stizolobium hassjoo* (*Velvet Bean*). L-DOPA merupakan senyawa yang dihasilkan tirosin dengan katalisis enzim tirosinase (Gambar 2.2). Ion Co^{2+} sebagai elisitor akan berikatan dengan reseptor pada membran dan terjadi perubahan aliran ion. Perubahan aliran ion akan mengaktivasi NADPH-oksidase yang mengakibatkan peningkatan jumlah *Reactive Oxygen Species* (ROS). Peningkatan jumlah ROS akan mengaktifkan ekspresi gen-gen pertahanan yang menghasilkan enzim-enzim salah satunya tirosinase yang mengkonversi tirosin menjadi L-DOPA. Peningkatan jumlah enzim tirosinase dan L-DOPA dapat meningkatkan akumulasi betasianin (Vasconsuelo dan Boland, 2007).

Pada kalus perlakuan warna coklat muncul selama elisitasi (Gambar 4.3). Diduga bahwa elisitor Co^{2+} mengaktivasi enzim tirosinase untuk membentuk betasianin dan senyawa fenol akibat adanya stres karena keberadaan elisitor. Menurut Pugh (1931) enzim tirosinase berperan dalam menghasilkan senyawa fenol. Oleh karena itu diduga bahwa elisitor Co^{2+} selain mengaktivasi enzim tirosinase untuk menghasilkan betasianin juga dapat mengaktivasi pembentukan senyawa fenol yang ditunjukkan dengan munculnya warna coklat sebagai bentuk respon terhadap stres.

Menurut Namdeo (2007), terdapat beberapa faktor yang mempengaruhi elisitasi yaitu konsentrasi elisitor, lamanya pemaparan dengan elisitor, lama kultur dan komposisi nutrisi. Kandungan betasianin meningkat hingga 60% pada kultur suspensi *Beta vulgaris* setelah penambahan Co^{2+} 5μM yang ditambahkan pada awal kultur (Tapia dkk., 2001). Sedangkan pada kultur kalus *C. argentea* penambahan elisitor Co^{2+} dengan konsentrasi 15 ppm dan lama kultur 10 hari mampu meningkatkan akumulasi betasianin sebesar 3,32 kali lebih tinggi dibandingkan kalus kontrol (0 ppm) pada lama kultur yang sama. Hal ini menunjukkan bahwa akumulasi betasianin optimum pada kalus *C. argentea* terjadi secara singkat, namun masih pada fase logaritmik pertumbuhan sel.

Berdasarkan uji korelasi antara akumulasi betasianin sebagai

metabolit sekunder dengan berat kering kalus sebagai hasil metabolit primer menunjukkan adanya korelasi positif antara keduanya (Lampiran 6). Korelasi positif terjadi pada perlakuan konsentrasi elisitor Co^{2+} 20 ppm. Hal ini ditunjukkan dengan pola yang sama pada akumulasi betasianin dan berat kering kalus yaitu meningkat hingga lama kultur 10 hari dan menurun pada lama kultur 15 hari, selanjutnya meningkat kembali pada lama kultur 20 hari. Hal ini menunjukkan bahwa betasianin disintesis seiring dengan pertumbuhan sel.

BAB V
PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Konsentrasi elisitor Co^{2+} tidak berpengaruh terhadap berat basah dan berat kering kalus, namun lamanya kultur memberikan pengaruh terhadap berat basah dan berat kering kalus *C. argentea*. Penambahan elisitor Co^{2+} pada konsentrasi 5 ppm dengan lama kultur 20 hari berdasarkan berat basah dan berat kering kalus menghasilkan pertumbuhan kalus cenderung paling baik.

Akumulasi betasianin dipengaruhi oleh interaksi antara konsentrasi elisitor Co^{2+} dan lama kultur. Pada konsentrasi elisitor Co^{2+} 15 ppm dengan lama kultur 10 hari, merupakan kombinasi yang paling baik dalam menghasilkan akumulasi betasianin optimum sebesar 498,62 µg /g BK bila dikultur selama 10 hari.

5.2 Saran

Disarankan agar menggunakan perlakuan lebih dari 3 ulangan, untuk menghindari hasil yang fluktuasinya besar.

DAFTAR PUSTAKA

Akita, T, Y. Hina dan N. Tanaka. 2000. **Production of Betacyanin by Cell Suspension Culture of Table Beet (*Beta vulgaris* L)**. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*64 (9): 1807-1812

Andrew, D. Parry, S. A .Tiller dan E. Robert. 1994. **The Effects of Heavy Metals and Root lmmersion on Isoflavonoid Metabolism in Alfalfa *(Medicago sativa L.)*.** *Plant Physiol.* (106): 195-202

Angelova. Z, S. Georgiev dan R. Werner. 2006. **Elicitation of Plant.** *Biotechnol. Eq.* 20 (2): 78-83

Cai, Y., S. Mei, Wu Huaixiang, H. Ronghua dan Harold C. 1998. **Characterization and Quantification of Betacyanin Pigments from Diverse *Amaranthus* Species.** *Agric. Food Chem.* 46 (6): 2288 - 2294

Cai, Y., M. Sun dan H. Corke. 2005. **Characterization and Application of Betalain Pigments from Plants of The Amaranthaceae.** *Food Sci. Technol.* 16, 370 – 376.

Chawla, H.S. 2002. **Introduction to Plant Biotechnology. Second Edition**. Science Publishers, Inc. United State of America.

Davies,K. 2004. **Plant Pigment and Their Manipulation**. *Ann. Plant Rev.* CRC Press and Blackwell Publishing USA.

DEPKES. 1985. **Peraturan Menteri Kesehatan Nomor : 239/Menkes /per/v/85. Tentang Zat Warna Tertentu yang Dinyatakan Sebagai Bahan Berbahaya**. Jakarta**.** http://www.bppom.com/2009/12/5/rodhamin B. Tanggal akses 5 Desember 2009.

Fitriani, A. 2003. **Pengaruh Pemberian Homogenat Jamur *Phythium aphanidermatum* (Edson) Fitz Terhadap Kandungan Ajmalisin dalam Kultur Kalus *Catharanthus roseus* (L.) G . Don**. *Jurnal Hayati.* 6:65-69.

Georgiev .V , M. Ilieva, T. Bley, dan A. Pavlov. 2008. **Betalain Production in Plant in vitro Systems**. *Acta. Physiol Plant*. 30: 581-593.

Gerritsen, V. B. 2000. **Pretty Pigments**. http:// www .protein spotlight. org. Tanggal akses 2 Oktober 2009.

Grotewold, E. 2006. **The Genetics and Biochemistry of Floral Pigments**. *Ann. Plant Biol.* 57:761-780.

Hirose, M., Y. Takashi, K. Tohru dan K. Atsushi. 1990. **Accumulation of Betacyanin in *Phytolacca americana* Cells and of Anthocyanin in Vitis sp. Cells in Relation to Cell Division in Suspension Cultures.** *Plant Cell Physiol*. 31(2): 267-271

IHW. 2003. ***Beet root* Pigments and Membrane**. http:// www .biologymad.com/resources/BEETROOT%20PIGMENT2.doc . Tanggal akses 1 Oktober 2009.

Jabs, T, M . Tscho-Pe, C.Colling, K. Hahlbrock, dan D.Scheel. 1997. **Elicitor Stimulated Ion Fluxes and O_2 from The Oxidative Burst are Essential Components in Triggering Defense Gene Activation and Phytoalexin Synthesis in Parsley.** *Plant. Bio. 94:* 4800–4805.

Libnets. 2009. ***Celosia argentea***. http:// libnts. avrdc. org.tw/ fulltext_pdf/ebook1/10-13%20celosia.pdf. Tanggal akses 21 Desember 2009.

Lila M. A. 2004. **Anthocyanins and Human Health: an in vitro Investigative Approach**. *Biomed. Biotech.* 5 : 306–313 .

Linden, C. James dan R. J. Stoner. **Proprietary Elicitor Responses Influence Seed Germination and Delays Fruit Senescence**. http:// www.YEAcrops.com. Tanggal akses 1 Oktober 2009.

Listiana W. 2010. **Bahaya Penggunaan Zat Warna pada Makanan.** http://duniaveteriner.com/2010/04/bahaya-penggunaan-zat-warna-pada-makanan/print. Tanggal akses 6 Juli 2010.

Maulidah, N. 2008. **Pengaruh Co^{2+} terhadap Kandungan Kuersetin pada Kalus Teh (*Camellia sinensis* L.O.Kuntz).** Skripsi. Jurusan Biologi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Brawijaya. Malang.

Mühlbach, H. P. 1998. **Use of Plant Cell Cultures in**

Biotechnology. *Biotechnol. Ann. Rev*. 4: 113-176.

Mulabagal V. dan Tsay Hsin-Sheng. 2004. **Plant Cell Cultures - An Alternative and Efficient Source for the Production of Biologically Important Secondary Metabolites**. *Int. J. App. Sci. Eng.* 2, 1: 29-48.

Namdeo, A. G. 2007**. Plant Cell Elicitation for Production of Secondary Metabolites.** *Pharm. Rev.*. 1(1): 69-79.

Narayanaswamy, S. 1994. **Plant Cell and Tissue Culture**. TATA Mc Graw - Hill Publishing Company Limited. New Delhi.

Palmen, N. 2005. **Cobalt and Cobalt Compounds**. Criteria document for Swedish Occupational Standards. Elanders Gotab. Stockholm. Http://www.arbetslivsinstitutet.se/. Tanggal akses 18 desember 2010.

Pan. X.W., S. Ya-Ya, L. Xin, G. Xiang, dan L. Ying-Tang. 2004. **Influence of Inorganic Microelements on the Production of Camptothecin with Suspension Cultures of *Camptotheca acuminate.*** *Plant Growth Reg*. 44: 59–63.

Pavlova A, P. Kovatchevaa, V. Georgiev, I. Kolevac and M. Ilievaa. 2002. **Biosynthesis and Radical Scavenging Activity of Betalains during the Cultivation of Red Beet (*Beta vulgaris*) Hairy Root Cultures.** *App. Microbiol. Z. Naturforsch*. 57c: 640-644.

Pugh, C. E. M. 1931. **Iron in Relation to Tyrosinase**. www.ncbi nlm.nih.gov/pmc/articles/.../pdf/biochemj01116-0125.pdf. Tanggal akses 28 Februari 2011.

Schliemann, W., Cai Y., T. Degenkolb, J. Schmidt dan H. Corke. 2001. **Betalains of *Celosia argentea*.** *Phytochem.* 58 (1): 159-165.

Silva, A.L.C., S.T. Cecilia., A.M. Renato dan, C. G.H. Anna. 2004. **Growth Characteristics and Dynamics of Protein Synthesis in Callus Cultures from *Glycine wightii* (wight & arn.) Verdc**. *Ciensc. Agrotec.* :29:1161-1166.

Smith, R. M. 2000. **Plant Tissue Culture: Techniques and Experiments.** Academic. San Diego.

Smits, E. AH.P., C.F. Quinn, W. Tapken, M. Malagolli dan M. Schiavon. 2009. **Physiological Function of Beneficial Elements.** *Plant Biol*. 12: 267-274.

Stintzing .F. C dan R. Carle. 2004. **Betalains Emerging Prospects for Food Scientists**. *Trends Food Sci. Technol.* 18: 514-525

Strack. D, T. Vogt, dan W. Schliemann. 2002. **Recent Advances in Betalain Research**. *Phytochem*. 62 : 247–269.

Sudirga, Sang Ketut., E. Marwani, dan R. R. Esyanti. 2004. **Peningkatan Kandungan Azadirachtin dalam Kultur Suspensi Sel *Azadirachta indica* dengan Elisitasi Ekstrak Ragi (*Saccaromyces cerevisiae*).** *J. Biologi.* 9 (1): 28-31.

Syahid, S. F., N.N. Kristina dan D. Seswita. 2010. **Pengaruh Komposisi Media Terhadap Pertumbuhan Kalus dan Kadar Tannin dari Daun Jati Belanda (*Guazuma ulmifora* Lamk.).** *J. Litri.* 16(1): 1-5.

Tapia, T. G., A. J. Aparicio , R. Monroy, A. De Jesus-Sanchez dan G. G. Lopez. 2001**. Influent of Cobalt and Other Microelement on The Production of Betalain and The Growth of Suspension Culture of *Beta vulgaris*.** *J. Plant. Biotech.* 67 :19-23.

Tesoriere. L, M. Allegra, D. Butera and M. A. Livrea. 2004**. Absorption, Excretion, and Distribution of Dietary Antioxidant Betalains in LDLs: Potential Health Effects of Betalains in Humans.** *Amer. J. Clin. Nutr.* 80:941–945.

Tjitrosoepomo, G. 1996. **Taksonomi Tumbuhan (Spermatophyta).** Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.

Vasconsuelo. A. dan R. Boland. 2007. **Molecular Aspects of the Early Stages of Elicitation of Secondary Metabolites in Plants.** *Plant Sci. Rev.*172:861-875.

Yarger. L. 2007. **Lagos Spinach**. http://www.echotech.org LagosSpinach07b.pdf. Tanggal akses 21 Desember 2009.

Zakiah Z, E. Marwani, dan A. H. Siregar. 2003. **Peningkatan Produksi Azadirahtin dalam Kultur Suspensi Sel *Azadirachta indica* A.Juss melalui Penambahan Skualen.** *Jurnal Matematika dan Sains.* 8 (4): 141 – 146.

Zhao, J. L., L. G. Zhou dan J. Y. Wu. 2010. **Effects of Biotic and Abiotic Elicitors on Cell Growth and Tanshinone Accumulation in *Salvia miltiorrhiza* Cell Cultures**. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87:137–144.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Komposisi Medium MS dan Pembuatan Stok Elisitor Co^{2+}

Tabel L.1.1. Standar pengambilan untuk pembuatan medium Murashige-Skoog (MS)

Larutan stok	Bahan	Jumlah (mg/L)	Berat (g) untuk volume 100ml	Pengambilan untuk 1 liter medium (ml)
A (5x)	NH_4NO_3	1650	8,28	20
B (5x)	KNO_3	1900	9,50	20
C (10x)	$CaCl_2.H_2O$	440	4,40	10
D (10x)	$MgSO_4.7H_2O$	370	3,70	10
	KH_2PO_4	170	1,70	
E (20x)	$FeSO_4.7H_2O$	27,8	0,56	5
	$Na_2EDTA.2H_2O$	37,3	0,75	
F (20x)	H_3BO_3	6,2	0,12	5
	$MnSO_4.4H_2O$	22,3	0,34	
	$ZnSO_4.7H_2O$	8,6	0,17	
G (20x)	KI	0,83	0,2	0,5
	$Na_2MoO_4.2H_2O$	0,25	0,05	
	$CuSO_4.5H_2O$	0,025	0,005	
	$CoCl_2.5H_2O$	0,025	0,005	
Vitamin	Nicotinic acid	0,5	0,05	1
	Pyridoxine - HCl	0,5	0,05	
	Thiamine - HCl	0,1	0,01	
	Glycine	2	0,20	
Myo	Myo-Inositol	100	1,00	10

Cara penghitungan stok Elisitor Co^{2+}

BM $CoCl_2.6H_2O$ = 237,9

BA Co = 58,98

Co^{2+} = $\frac{\text{BM } CoCl_2.6H_2O}{\text{BA Co}}$ x 100mg

= $\frac{237,9}{58,98}$ x 100

= 403,357 mg

= 0,4033 g/100 ml aquades

Cara pengambilan elisitor dari larutan stok dapat dilakukan dengan perhitungan sebagai berikut :

$$V1.N1=V2.N2$$

Keterangan:

V1 : volume awal V2 : volume akhir

N1 : konsentrasi awal N2 : konsentrasi akhir

Tabel L 1.2. Pengambilan larutan stok elisitor Co^{2+}

Konsentrasi elisitor Co^{2+}(mg/L)	Pengambilan larutan stok untuk 1 L medium (ml)
0	0
5	5
10	10
15	15
20	20

Lampiran 2. Cara penghitungan larutan asam askorbat 50mM dalam 100ml Metanol 80%

Mr as. Askorbat = 176,13

50mM x 176,13 = 8806,5 mg/L

= 8,8065g/L

Dalam 100mL as.askorbat 50mM

$\frac{100}{1000}$ x 8,8065g = 0,881g/L

Lampiran 3. Pertumbuhan Kalus dan Akumulasi betasianin *Celosia argentea* Linn.

Tabel L 3.1 Rata- rata berat basah dan berat kering kalus *Celosia argentea* Linn. kontrol dan dengan penambahan Co^{2+} selama perlakuan.

Konsentrasi Co^{2+} (ppm)	Lama kultur (hari)	Rata-rata berat basah (g)±SD (n=3)	Rata-rata berat kering (g)± SD (n=3)
0	5	1.011±0.135	0.097±0.011
	10	1.381±0.208	0.126±0.018
	15	2.432±0.329	0.176±0.023
	20	2.400±0.603	0.183±0.056
5	5	1.167±0.132	0.105±0.002
	10	1.423±0.160	0.132±0.011
	15	2.222±0.238	0.168±0.029
	20	2.971±1.172	0.181±0.032
10	5	1.328±0.148	0.125±0.003
	10	2.243±0.458	0.150±0.011
	15	2.152±0.466	0.148±0.024
	20	2.219±0.512	0.161±0.019
15	5	1.451±0.266	0.147±0.024
	10	1.562±0.075	0.150±0.021
	15	1.858±0.215	0.152±0.023
	20	1.937±0.443	0.148±0.003
20	5	1.082±0.165	0.104±0.005
	10	2.007±0.138	0.172±0.008
	15	2.018±0.374	0.161±0.042
	20	1.954±0.246	0.176±0.037

Tabel L 3.2. Rata- rata akumulasi betasianin pada kalus *Celosia argentea* Linn. kontrol dan penambahan Co^{2+} selama perlakuan.

Konsentrasi Co^{2+} (ppm)	Lama kultur (hari)	akumulasi betasianin (µg/g berat kering) ±SD (n=3)*
0	5	188.88±81.19 ab
	10	124.21±10.21 a
	15	290.40±49.28 c
	20	127.50±21.30 a
5	5	253.28±49.21 b
	10	263.36±49.21 b
	15	135.99±72.06 a
	20	137.96±40.87 a
10	5	143.74±70.17 a
	10	161.68±62.24 ab
	15	180.80±53.11 ab
	20	169.49±54.60 ab
15	5	202.59±31.50 ab
	10	498.62±81.99 d
	15	135.45±12.19 a
	20	126.58±26.43 a
20	5	182.66±46.81 ab
	10	263.41±12.01 b
	15	210.78±95.76 b
	20	280.62±59.28 c

*Keterangan : Huruf yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan uji Duncan dengan selang kepercayaan 5%.

Lampiran 4. Hasil Analisis Ragam

Tabel L 4.1. Uji Ragam Antar Subyek

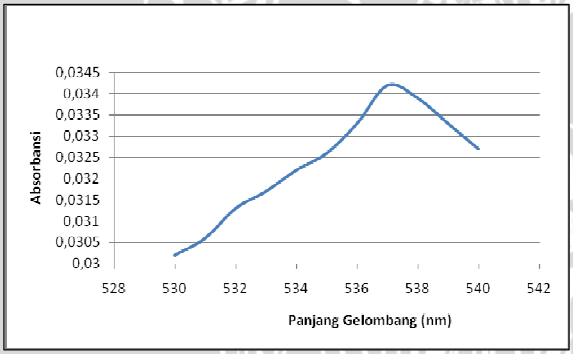
Sumber keragaman	Variabel terikat	JK	db	Kuadrat tengah	F_{hitung}	Sig.
Lama Elisitasi	BB	10.663	3	3.554	21.618	.000
	BK	.026	3	.009	13.726	.000
	betasianin	34765.478	3	11588.493	3.786	.018
Konsentrasi	BB	.702	4	.176	1.068	.385
	BK	.001	4	.000	.280	.889
	betasianin	39418.112	4	9854.528	3.219	.022
Konsentrasi * Lama Elisitasi	BB	4.188	12	.349	2.123	.037
	BK	.012	12	.001	1.312	.127
	betasianin	367816.811	12	30651.401	10.014	.000
Galat	BB	6.576	40	.164		
	BK	.025	40	.001		
	betasianin	122436.233	40	3060.906		
Total	BB	225.670	60			
	BK	1.378	60			
	betasianin	2929236.389	60			

a. R Squared = .703 (Adjusted R Squared = .562)
b. R Squared = .606 (Adjusted R Squared = .420)
c. R Squared = .783 (Adjusted R Squared = .680)

Lampiran 5. Nilai absorbansi betasianin kalus *C. argentea* pada beberapa panjang gelombang

Tabel L 5.1 Nilai absorbansi betasianin kalus *C. argentea* pada beberapa panjang gelombang

Panjang gelombang (λ)	Nilai absorbansi
540	0.0327
539	0.0333
538	0.0339
537	0.0342
536	0.0333
535	0.0326
534	0.0322
533	0.0317
532	0.0313
531	0.0386
530	0.0302



Gambar L. 1. Nilai absorbansi betasianin kalus C.*argentea*.

Lampiran 6. Uji Korelasi Antar Subyek

Tabel L 6.1. Uji Korelasi Antar Subyek

		Konsentrasi	lama_elisitasi	kandungan_betasianin	berat_basah	berat_keing
Konsentrasi	Pearson Correlation	1	.000	.107	-.077	.095
	Sig. (2-tailed)		1.000	.416	.559	.469
	N	60	60	60	60	60
lama_elisitasi	Pearson Correlation	.000	1	-.117	.678**	.610**
	Sig. (2-tailed)	1.000		.372	.000	.000
	N	60	60	60	60	60
kandungan_betasianin	Pearson Correlation	.107	-.117	1	-.168	.037
	Sig. (2-tailed)	.416	.372		.200	.780
	N	60	60	60	60	60
berat_basah	Pearson Correlation	-.077	.678**	-.168	1	.771**
	Sig. (2-tailed)	.559	.000	.200		.000
	N	60	60	60	60	60
berat_keing	Pearson Correlation	.095	.610**	.037	.771**	1
	Sig. (2-tailed)	.469	.000	.780	.000	
	N	60	60	60	60	60

**. Correlation is significant at the0.01 level (2-tailed).

* Correlation is significant at the0.05 level (2-tailed).