PENGARUH SUKROSA DAN GLUKOSA TERHADAP PERTUMBUHAN DAN AKUMULASI BETASIANIN KALUS *Celosia argentea*

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains dalam bidang Biologi

oleh:
INDY RODLIYAH
0710910029-91

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

HALAMAN PENGESAHAN SKRIPSI

Pengaruh Sukrosa dan Glukosa terhadap Pertumbuhan dan Akumulasi Betasianin Kalus *Celosia argentea*

Oleh:
Indy Rodliyah
0710910029-91

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji pada tanggal
23 Desember 2011
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh
gelar Sarjana Sains dalam bidang Biologi

Pembimbing I	Pembimbing II
Ir. Retno Mastuti, M.Agr.Sc.,D.Agr.Sc	**Drs. Edi Priyo Utomo M.S**
NIP.196505091990022001	**NIP. 195712271986031003**

Mengetahui,

Ketua Jurusan Biologi

Widodo, S.Si., M.Si, Ph.D., Med.Sc
NIP. 197308112000031002

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Indy Rodliyah
NIM : 0710910029
Jurusan : Biologi
Penulis skripsi berjudul: Pengaruh Sukrosa dan Glukosa terhadap Pertumbuhan dan Akumulasi Betasianin Kalus *Celosia argentea*

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 menaggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan segala kesadaran

Malang, 23 Desember 2011
Yang Menyatakan

(Indy Rodliyah)
NIM. 0710910029

Pengaruh Sukrosa dan Glukosa terhadap Pertumbuhan dan Akumulasi Betasianin Kalus *Celosia argentea*

Indy Rodliyah[1], Retno Mastuti[1], Edi Priyo Utomo[2]
[1]Jurusan Biologi, [2]Jurusan Kimia, Fakutas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh beberapa konsentrasi sukrosa dan glukosa terhadap pertumbuhan dan akumulasi betasianin kalus *Celosia argentea* pada fase logartimik. Kalus diinduksi dari eksplan kotiledon hasil perkecambahan *in vitro* pada medium MS dengan ZPT NAA 2 ppm dan BAP 2 ppm. Pengaruh beberapa konsentrasi sukrosa dan glukosa masing-masing 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6% terhadap pertumbuhan (berat basah dan kering) dan akumulasi betasianin diamati pada kultur kalus selama fase log (6, 12, dan 18 hari). Kalus kering diperoleh dengan menggunakan *freeze drying*. Betasianin diperoleh dari hasil ekstrasi kalus kering dengan pelarut methanol 80% dan asam askorbat 55 mM kemudian kadarnya diukur dengan spektrofotometer pada λ 536 nm. Pertumbuhan kalus *C. argentea* berdasarkan berat basah dan berat kering pada fase logaritmik (6, 12 dan 18 hari) tidak dipengaruhi oleh jenis dan konsentrasi sumber karbon tetapi dipengaruhi oleh lama kultur. Pertumbuhan kalus yang optimum dihasilkan 1,744 g dan 1,475 g pada lama kultur 18 hari dibandingkan lama kultur 6 dan 12 hari baik pada perlakuan sukrosa maupun glukosa. Kandungan betasianin pada fase logaritmik (6, 12 dan 18 hari) hanya dipengaruhi oleh konsentrasi sumber karbon serta interaksi antara jenis sumber karbon dan lama kultur. Kandungan betasianin tertinggi (31,2 µg/g berat kering) dihasilkan bila ditambahkan sumber karbon 2%. Kandungan betasianin meningkat secara signifikan pada lama kultur 12 hari dan 18 hari masing-masing pada perlakuan sukrosa dan glukosa.

Kata kunci : Betasianin, *Celosia argentea*, glukosa, kalus, sukrosa

Influence of sucrose and glucose on growth and accumulation of betacyanin callus *Celosia argentea*

Indy Rodliyah[1], Retno Mastuti[1], Edi Priyo Utomo[2]
[1] Departement of Biology, [2] Departement of Chemistry, Faculty of Mathematic and Science, University of Brawijaya, Malang

Abstract

The aim of reaserch was to know the effect of sucrose and glucose in various concentrations on growth and accumulation betacyanin callus *Celosia argentea* in logarithmic phase. Callus induced in MS medium supplemented with 2 ppm NAA and 2 ppm BAP from in vitro-derived cotyledone explants the effect of sucrose and glucose in various concentration 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6% on growth (wet and dry weight) and accumulation betacyanin were observed on callus cutured in logarithmic phase (6, 12 and 18 days). Callus dry weight was obtained by freeze drying. Betacyanin was obtained from ectract of callus dry weight dissolved by methanol 80% and 55 mM ascorbic acid, and then the content was measured by spectrofotometry at λ 536 nm. Growth of *C. argentea callus* in logarithmic phase (6, 12 and 18 days) was not influenced by kind and concentration of carbon sources but influenced by length of culture. Optimum growth of callus resulted 1,744 g and 1,475 g was obtained at 18 days by addition of either sucrose or glucose. Betacyanin accumulation in logarithmic phase (6, 12 and 18 days) was influenced by concentration of carbon sources and interaction between kind of carbon sources and length of culture. The highest of betacyanin content (31,2 µg/g dry weight) was obtained if the medium was supplemented with carbon source 2%. Betacyanin accumulation increase significantly at 12 days and 18 days of culture supplemented with sucrose and glucose, respectively.

Key word: Betacyanin, callus, *Celosia argentea*, glucose, sucrose.

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, segala puji bagi Allah SWT dengan segala rahmat, taufik dan hidayahNya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi dengan judul "Pengaruh Sukrosa dan Glukosa terhadap Pertumbuhan dan Akumulasi Betasianin Kalus *Celosia argentea*" 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. Edi Priyo Utomo, MS. selaku pembimbing yang telah memberikan bimbingan, dukungan dan pengarahan penulisan skripsi.
2. Dr. Wahyu Widoretno, M.Si., Dra. Anna Roosdiana, M.App.Sc 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. Pimpinan Pondok Modern Darussalam Gontor DR(HC). KH. Abdulloh Syukri Zarkasyi, MA., KH. Hasan Abdulloh Sahal dan KH. Syamsul Hadi Abdan, S.Ag serta DR. KH. Amal Fathulloh, MA. yang telah mendukung penulis secara moril dan materiil.
5. Mbak Wati dan Pak Sugi sebagai laboran Lab. FKM yang telah banyak membantu selama penelitian serta para peneliti di FKM (Mbak Ratna, Mbak Yayuk, Mbak Nia, Mbak Dwi, Mbak Lilik, Mbak Devi dan Mbak Ita) yang selalu memberikan semangat dan do'a.
6. Suami tercinta yang selalu memberikan waktu, dukungan, semangat dan do'a dalam setiap langkah dan penelitian hingga selesainya penulisan ini.
7. Keluarga tercinta (Bapak, Ibu, adik-adik) yang selalu memberikan dukungan, semangat dan do'a.
8. Teman-teman yang membantu dalam penelitian (Mbak Aziz, Lutfi, Dian, Rona dan Riza) serta teman-teman angkatan 2007 atas bantuannya dalam penelitian, do'a dan semangat yang diberikan.
9. 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 bermanfaat bagi pembaca dan keberlangsungan penelitian yang terkait.

Malang, 23 Desember 2011

Penulis

DAFTAR ISI

Halaman

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

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

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA
2.1. Keberadaan Pigmen Betasianin 4
2.2. Biosintesis dan struktur Pigmen Betasianin 5
2.3. Manfaat Betasianin 7
2.4. Pengaruh Sukrosa dan Glukosa terhadap Akumulasi Pigmen Betasianin 8
2.5. Kuantifikasi Betasianin 10

BAB III. METODE PENELITIAN
3.1. Waktu dan Tempat Penelitian 11
3.2. Rancangan Penelitian 11
3.3. Pembuatan Media Kultur 11
3.4. Perkecambahan Biji Secara *in vitro* 12

3.5. Induksi dan Pemeliharaan Kalus 12
3.6. Kurva Pertumbuhan 13
3.7. Perlakuan medium glukosa dan sukrosa 13
3.8. Pengamatan morfologi dan pertumbuhan kalus 13
3.9. Kuantifikasi Betasianin 13
3.10. Analisis Data 14

BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN
4.1. Induksi Kalus *Celosia argentea* dan Kurva Pertumbuhan 15
4.2. Pengaruh sukrosa dan glukosa terhadap pertumbuhan kalus *Celosia argentea* 16
4.3. Pengaruh sukrosa dan glukosa terhadap kandungan betasianin kalus *Celosia argentea* 24

BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN
5.1. Kesimpulan 28
5.2. Saran 28

DAFTAR PUSTAKA 29

LAMPIRAN 32

DAFTAR GAMBAR

Gambar **Judul** **Halaman**

1. Biosintesis pigmen betasianin …… 6
2. Sub klas pigmen betasianin 7
3. Peran Sumber karbon dalam biosintesis betasianin…. 9
4. Pertumbuhan kalus *C. argentea* pada medium pemeliharaan selama 30 hari…….. 16
5. Pengaruh Jenis Sumber karbon terhadap berat basah dan berat kering kalus *C. argentea* …… 17
6. Pengaruh konsentrasi sumber karbon terhadap berat basah kalus *C.argentea* ……. 18
7. Pengaruh konsentrasi sumber karbon terhadap berat kering kalus *C.argentea* …… 19
8. Pengaruh lama kultur terhadap berat basah kalus *C. argentea* ..…….. 20
9. Pengaruh lama kultur terhadap berat kering kalus *C. argentea*……. 21
10. Pengaruh perlakuan Sukrosa dan Lama Kultur terhadap Morfologi Kalus *C. argentea*…… 22
11. Pengaruh perlakuan Glukosa dan Lama Kultur terhadap Morfologi Kalus *C. argentea*……. 23
12. Pengaruh konsentrasi sumber karbon terhadap kandungan betasianin kalus *C.argentea*……... 25
13. Pengaruh interaksi jenis sumber karbon dan lama kultur terhadap kandungan betasianin kalus *C.argentea*……... 27
14. Hasil uji kualitatif……... 45

DAFTAR TABEL

Tabel **Judul** **Halaman**

1. Ordo Caryophyllales yang menghasilkan betalain dan anthosianin 5
2. Komposisi Medium Dasar MS (Murashige dan Skoog) 32
3. Komposisi Larutan Stok Media MS dengan Volume 100 mL 33
4. Penentuan berat sukrosa dan glukosa yang dilarutkan dalam 1 L media MS 34
5. Rata-rata Berat kalus basah sebagai hasil kurva Pertumbuhan 35
6. Rata-rata pertumbuhan kalus (g) dengan medium sukrosa ± SD (n=3) 36
7. Rata-rata pertumbuhan kalus (g) dengan medium glukosa ± SD (n=3) 36
8. Kandungan betasianin (µg/g) dengan medium Sukrosa dan glukosa ± SD (n=3) 37
9. Peningkatan berat basah (g)pada lama kultur 0-18 hari 37
10. Peningkatan kandungan betasianin (µg/g berat kering) pada lama kultur 6 - 18 hari 38
11. Uji analisis ragam antar subjek pada berat kalus basah (g) 40
12. Uji analisis ragam berdasarkan uji Games howell pada berat kalus basah (g) yang dipengaruhi oleh lama kultur (hari) 40
13. Uji analisis ragam antar subjek pada berat kalus kering (g) 41
14. Uji analisis ragam berdasarkan uji Games howell pada berat kalus kering (g) yang dipengaruhi oleh lama kultur (hari) 41

15. Uji analisis ragam antar subjek pada kandungan betasianin (µg/g) 42
16. Uji analisis ragam berdasarkan uji Games howell pada kandungan betasianin (mg/g) yang dipengaruhi oleh lama kultur (hari) 43
17. Uji analisis ragam berdasarkan uji Games howell pada kandungan betasianin (µg/g) yang dipengaruhi oleh konsentrasi (sukrosa dan glukosa (1-6) 43
18. Hasil absorbansi maksimum sampel kalus *C. argentea* 45

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Judul	Halaman
1.	Komposisi Medium Dasar MS (Murashige dan Skoog) ...	32
2.	Komposisi Larutan Stok Media MS, Penentuan Berat Sukrosa dan Glukosa dan perhitungan larutan pengencer	33
3.	Rata-rata Berat kalus basah sebagai hasil kurva pertumbuhan.....	35
4.	Pertumbuhan Kalus dan Kandungan Betasianin	36
5.	Hasil Analisis Ragam (ANOVA) Pengaruh Sumber karbon (SB), Konsentrasi (K) dan Lama Kultur (LH) pada Berat basah, berat kering dan Kandungan Betasianin	40
6.	Hasil uji kualitatif sampel menggunakan Spektrofotometer UV-VIS	45

PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum 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.

DAFTAR SINGKATAN

NAA	: *Naphtalentacetic acid*
BAP	: *Benzylaminopurine*
BB	: Berat Basah
BK	: Berat Kering
UV	: Ultraviolet
ZPT	: Zat Pengatur Tumbuh
MS	: Murashige-Skoog
LAF	: Laminar Air Flow
UV-VIS	: *Ultraviolet Visible*
ppm	: *part per million*

BAB I
PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Warna bunga dan buah merupakan suatu hal yang mendukung keindahan suatu tanaman. Keindahannya dapat digunakan sebagai penarik polinator yaitu untuk membantu penyerbukan dan penyebaran biji (Grotewold, 2006). Pendaran warna bunga dan buah tersebut dimanfaatkan manusia sebagai pewarna alami pada makanan, kosmetik dan obat (Georgiev, 2008). Menurut Cai dkk. (1999) dan Georgiev (2008) pada 20 tahun terakhir ini beberapa negara maju telah meningkatkan penggantian pewarna sintetik dengan pewarna alami karena pewarna alami mempunyai potensi sebagai antioksidan dan *radical scavenging* untuk perlindungan terhadap gangguan yang disebabkan oleh stress oksidatif sehingga aman bagi kesehatan. Pewarna alami tersebut berasal dari bagian tumbuh-tumbuhan yang mempunyai pigmen. Salah satu pigmen yang digunakan sebagai pewarna alami adalah pigmen betasianin.

Pigmen betasianin merupakan salah satu anggota klas pigmen betalain yang mengekspresikan warna merah-ungu pada bunga, buah maupun pada organ vegetatif yang lainnya. Pada Angiospermae, pigmen ini hanya ditemukan pada tumbuhan ordo Caryophyllales, salah satunya adalah Genus *Celosia* yang merupakan anggota famili Amaranthaceae (Cai dkk. (1999). *Celosia* yang berasal dari daerah subtropis di bagian Afrika, Amerika Selatan dan Asia Tenggara terdiri dari 60 spesies (Schliemann, dkk. 2001). Pigmen betasianin mempunyai beberapa subklas, diantaranya adalah amaranthin. Menurut Schliemann dkk. (2001) sub klas amaranthin ($C_{30}H_{35}N_2O_{19}$) dengan massa 726 m/z ($[M+H]^+$) merupakan kandungan betasianin yang paling dominan pada bunga *C. cristata* berwarna merah. Hal ini berarti bahwa kadar pigmen betasianin pada bunga *C. cristata* berwarna merah dapat diukur berdasarkan kadar subklas amaranthin. Oleh karena itu, dengan adanya kandungan betasianin (amaranthin) pada *C. cristata* yang terbanyak dibandingkan kandungan betalain lainnya, maka diharapkan bunga tersebut dapat digunakan sebagai alternatif sumber pewarna alami betasianin.

Akumulasi metabolit sekunder yang diperoleh melalui teknik konvensional (perolehan metabolit sekunder secara *in vivo*)

membutuhkan waktu yang relatif lama sehingga diperlukan teknik alternatif lain untuk menghasilkan metabolit sekunder dalam waktu yang lebih singkat dan dalam jumlah banyak. Salah satu alternatif untuk menjawab permasalahan ini adalah melalui teknik kultur jaringan. Produksi senyawa metabolit sekunder melalui kultur jaringan ini memiliki beberapa kelebihan antara lain produksi metabolit sekunder tidak tergantung pada lingkungan terutama musim sehingga akumulasi metabolit sekunder dapat dilakukan setiap saat yang dapat menjamin kontinuitas, kuantitas dan kualitas produksinya. Selain itu, produksi senyawa metabolit sekunder melalui kultur jaringan tidak membutuhkan tempat yang luas, dan waktu yang terlalu lama serta kondisinya selalu terkontrol dengan baik dibandingkan teknik konvensional (Georgiev dkk., 2008). Akumulasi metabolit sekunder dapat diinduksi dengan teknik kultur jaringan tumbuhan melalui perubahan komposisi media, salah satunya adalah jenis sumber karbon dengan variasi konsentrasi (Fowler, 1983).

Sumber karbon digunakan sebagai sumber energi dalam media kultur, karena umumnya bagian tanaman atau eksplan yang dikulturkan bersifat heterotrof dan mempunyai laju fotosintesis yang rendah. Pada medium dasar MS digunakan sukrosa sebanyak 3% (30 gram/L). Menurut Schleimann, dkk. (2001) produksi metabolit sekunder yang diperoleh melalui kultur jaringan dapat dipengaruhi oleh perubahan konsentrasi sumber karbon. Variasi konsentrasi sumber karbon dapat digunakan untuk mengetahui potensi yang berpengaruh maksimal dalam produksi metabolit sekunder. Sukrosa dan glukosa merupakan sumber karbon yang efektif dalam produksi metabolit sekunder melalui kultur jaringan dibandingkan sumber karbon yang lainnya (Mizukami, dkk. 1991). Sukrosa merupakan sumber karbon yang berfungsi sebagai sumber energi dan juga berfungsi untuk keseimbangan tekanan osmotik media (Soekma, 2009). Menurut Khan (2008) sukrosa merupakan senyawa disakarida ($C_{12}H_{22}O_{11}$) yang merupakan gabungan dari senyawa monosakarida yaitu glukosa dan fruktosa.

Menurut Silva (2004) dalam sistem kultur jaringan tanaman, proses metabolisme dan asimilasi memerlukan sumber karbon dalam konsentrasi 1% hingga 6%. Akumulasi kandungan betasianin maksimal pada kultur suspensi *Phytolacca americana* diperoleh pada medium MS dengan penambahan sukrosa 88 mM. Sedangkan pada penambahan sukrosa 234 mM kultur suspensi *Phytolacca americana* hanya dapat

mengakumulasi sedikit betasianin namun dapat meningkatkan jumlah sel (Sakuta dkk., 1987). Selain itu, pada kultur suspensi *Beta vulgaris* metabolit sekunder maksimum diperoleh pada medium B5 dengan penambahan 10 g/l sukrosa dan pada medium LS dengan penambahan 20 g/l sukrosa (Akita dkk., 2000). Menurut Mizukami, dkk. (1990) kultur kalus Rosella *(Hibiscus sabdariffa)* dapat mengakumulasi pigmen anthosianin secara maksimum dengan penambahan glukosa 3% pada medium kultur. Hal tersebut menunjukkan bahwa variasi konsentrasi sukrosa maupun glukosa pada medium kultur dapat berpengaruh terhadap produksi metabolit sekunder maupun primer. Oleh karena itu, pada penelitian ini ingin diketahui apakah variasi konsentrasi sukrosa dan glukosa dapat mempengaruhi pertumbuhan dan akumulasi betasianin pada kalus *Celosia argentea*.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, diperoleh permasalahan, yaitu:

1. Bagaimana pengaruh beberapa konsentrasi sukrosa dan glukosa terhadap pertumbuhan kalus *Celosia argentea* pada fase logaritmik?
2. Bagaimana pengaruh beberapa konsentrasi sukrosa dan glukosa terhadap akumulasi pigmen betasianin kalus *Celosia argentea* pada fase logaritmik?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan yang akan dicapai dalam penelitian ini adalah:

1. Mengetahui pengaruh beberapa konsentrasi sukrosa dan glukosa terhadap pertumbuhan kalus *Celosia argentea* pada fase logaritmik.
2. Mengetahui pengaruh beberapa konsentrasi sukrosa dan glukosa terhadap akumulasi pigmen betasianin kalus *Celosia argentea* pada fase logaritmik.

1.4 Manfaat

Manfaat yang dapat diambil dari penelitian ini adalah *Celosia argentea* dapat digunakan sebagai alternatif sumber betasianin yang dimanfaatkan secara berkelanjutan sehingga kebutuhan akan bahan alami dapat terpenuhi. Selain itu, *Celosia argentea* diharapkan dapat menjadi salah satu tanaman lokal yang dikomersialkan di dunia.

BAB II
TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Keberadaan Pigmen Betasianin

Pigmen betasianin yang mempunyai warna merah-ungu merupakan pigmen larut air yang mengandung nitrogen merupakan salah satu anggota pigmen betalain. Pigmen betalain merupakan salah satu anggota pigmen yang terekspresi pada bunga dan buah selain pigmen anthosianin dan carotenoid (Grotewold, 2006). Pigmen betalain dan anthosianin tidak pernah muncul pada tumbuhan yang sama karena mempunyai sifat *mutually exclusive*, yang artinya jika suatu tumbuhan telah mengekspresikan pigmen betalain maka tumbuhan tersebut tidak akan mengekspresikan pigmen anthosianin. Pigmen betalain merupakan salah satu metabolit sekunder dari kelompok flavonoid yang bernitrogen. Flavonoid merupakan salah satu anggota dari fenolik yang merupakan metabolit sekunder yang ditemukan pada tumbuhan.

Pada Angiospermae pigmen betasianin hanya terdapat pada ordo Caryophyllales. Ordo Caryophyllales dibagi menjadi 2 sub ordo yaitu Chenopodiinae merupakan sub ordo yang menghasilkan betalain dan tidak mengandung anthosianin serta Caryophyllineae merupakan sub ordo yang menghasilkan anthosianin dan tidak mengandung betalain (Tabel 1). Menurut Moreno dkk. (2008) sebagian besar genus dari sub ordo Chenopodiinae yaitu *Lampranthus, Mesembryanthumum, Hylocereus, Opuntia, Schlumbergera, Amaranthus, Gomphrena, Celosia, Beta, Suaeda, Boerhavia* dan *Bougainvillea* mengandung pigmen klas betasianin berwarna merah-ungu sedangkan genus yang lainnya yaitu *Portulaca, Bougainvillea, Lampranthus, Mesembryanthumum, Schlumbergera, Myrtillococtus, Selenicereus,* dan *Beta* mengandung pigmen betasantin berwarna kuning-oranye yang merupakan klas lain dari pigmen betalain. Pigmen betasianin pada tumbuhan Angiospermae, disimpan dalam vakuola terutama jaringan epidemal/subepidermal sebagai glikosida (Grotewold, 2004). Selain pada Angiospermae pigmen betalain juga ditemukan pada fungi tingkat tinggi, yaitu pada *Amanita muscaria.*

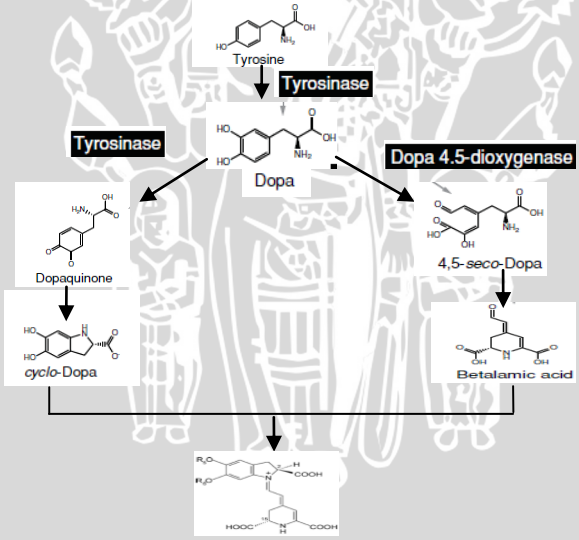
Tabel 1. Ordo Caryophyllales yang menghasilkan betalain dan anthosianin (Zryd dan Christinet, 2004)

Sub Ordo	Famili	Contoh Genus
Chenopodiineae (menghasilkan betalain, tidak mengandung anthosianin)	Achatocarpaceae	*Achatocarpus*
	Aizoaceae	*Dorotheanthus, Mesembryanthemum, Carpobrotus*
	Amaranthaceae	*Amaranthus,Celosia, Gomphrena, Iresine*
	Basellaceae	*Basella*
	Cactaceae	*Mammillaria, Opuntia, Pereskia*
	Chenopodiaceae	*Beta, Chenopodium, Spinacia*
	Didiereaceae	*Didierea*
	Halophytaceae	*Halophytum*
	Hectorellaceae	*Hectorella*
	Nyctaginaceae	*Bougainvillea, Mirabilis*
	Phytolacaceae	*Phytolacca, Gisekia*
	Portulacaceae	*Portulaca, Claytonia*
	Stegnopermataceae	*Stegnospermae*
Caryophyllianeae (menghasilkan anthosianin, tidak mengandung betalain)	Caryophyllaceae	*Dianthus, Silene*
	Molluginaceae	*Mollugo, Limeum*

2.2 Biosintesis dan struktur Pigmen Betasianin

Betasianin adalah salah satu pigmen betalain yang berwarna merah-ungu dan mempunyai hasil absorbansi maksimum (λ_{mak} 530-550 nm) (Christinet, 2004). Pigmen ini disintesis dari hasil konjugasi antara asam betalamat dengan *cyclo* DOPA. Asam betalamat merupakan

kromofor utama sebagai pembentuk warna betalain. Jika tidak terdapat asam betalamat maka betasianin tidak akan terbentuk. Prekursor utama pembentuk betasianin adalah tirosin. Tirosin dengan bantuan enzim *tyrosinase* membentuk DOPA. Enzim *tyrosinase* mempunyai fungsi ganda yaitu sebagai pembentuk tirosin menjadi DOPA dan membentuk DOPA menjadi Dopaquinone. Selain membentuk Dopaquinone yang dibentuk dengan enzim *tyrosinase*, DOPA mensintesis 4.5 *seco* DOPA dengan enzim DOPA 4.5 dioxygenase. Selanjutnya masing-masing struktur tersebut mengalami siklisasi menjadi strukur yang lain yaitu Dopaquinone menjadi *cyclo* DOPA dan 4.5 *seco* DOPA menjadi asam betalamat (Grotewold, 2006). Pembentukan asam betalamat dari DOPA membutuhkan pembelahan ekstraordinal ikatan 4.5 yang dibawa oleh DOPA dioxygenase. Hal ini pertama kali diidentifikasi pada *Basidiomycetes fly agaric (Amanita muscuria).* Pada langkah selanjutnya terjadi konjugasi melalui reaksi aldimin antara asam betalamat dan *cyclo* DOPA untuk membentuk betasianin. Tahapan reaksi aldimin diduga terjadi secara spontan karena hingga kini enzim yang mengkatalisis belum teridentifikasi.

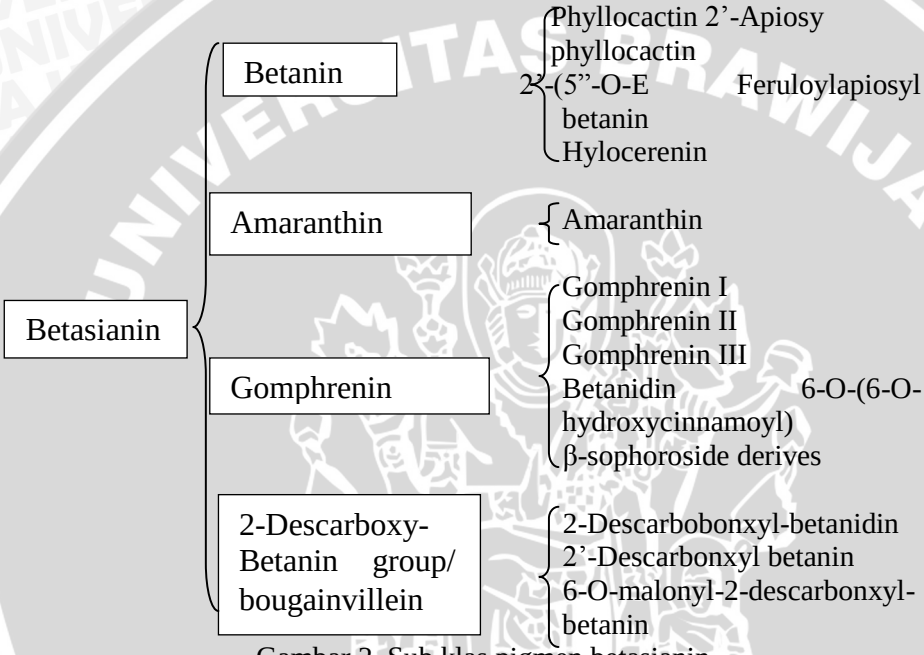


Betasianin

(R=H, bougainvillein; R=5-O-Glc, betanin; R=5-O-glc-2-O-Glc, amaranthin; R=6-O-Glc, gomphrenin)

Gambar 1. Biosintesis pigmen betasianin

Berdasarkan struktur kimianya klas betasianin dapat diklasifikasikan menjadi 4 subklas yaitu subklas betanin dengan absorbansi maksimum pada λ 530 nm, subklas amaranthin dengan absorbansi maksimum pada λ 534 – 537 nm, subklas gomphrenin dengan absorbansi maksimum pada λ 539 – 550 nm dan subklas bougainvillein dengan absorbansi maksimum pada λ 533 nm (Han dkk., 2009) (gambar 2)



Gambar 2. Sub klas pigmen betasianin.

2.3 Manfaat Betasianin

Pigmen alami dari tumbuhan semakin banyak dimanfaatkan untuk pewarna makanan dan kosmetik menggantikan pewarna sintetik yang telah banyak terbukti memberikan dampak buruk bagi kesehatan lingkungan maupun manusia. Salah satu pigmen tersebut adalah betasianin dimana pigmen ini banyak dimanfaatkan oleh manusia sebagai sumber pewarna alami. Betasianin bersifat lebih stabil dibandingkan anthosianin sehingga warna yang dihasilkan lebih baik dan tidak pudar dibandingkan dengan anthosianin. Selain itu pigmen ini

bersifat lebih hidrofilik (larut dalam air) dibandingkan dengan anthosianin (Stintzing dan Carle, 2007).

Fungsi betasianin bagi tanaman penghasil pigmen tersebut antara lain dapat digunakan sebagai penarik polinator untuk membantu penyerbukan dan penyebaran biji, memberikan perlindungan dari bahaya sinar UV yang tidak diproduksi oleh anthosianin, memberikan sinyal penolak insekta contohnya pada kaktus, dan dapat meningkatkan resistensi bagian tanaman pada bawah tanah dari patogen tanah (Georgiev, 2008).

Betasianin ini menarik untuk dimanfaatkan karena mempunyai sifat antioksidan dan *radical scavenging* sebagai perlindungan terhadap gangguan yang disebabkan oleh stress oksidatif sehingga dapat memenuhi kesehatan (Georgiev, 2008). Selain itu, betasianin mempunyai bermacam-macam fungsi yang hingga saat ini sangat diperlukan oleh manusia, antara lain dapat digunakan sebagai anti-inflamatory (Allegra, 2005), *hepatoprotective* (Galati dkk., 2005), dan *cancer chemo-preventative activities* (Kapadia dkk., 1996). Menurut Sreekanth dkk. (2007), betasianin dapat menginduksi apoptosis pada penderita *chronic mylloid leukemia cell*. Hal ini menunjukkan bahwa betasianin tidak mempunyai hepatokarsinogenik, dan bukan mutagen sehingga tidak mempunyai efek negatif pada manusia (Schwartz dan von Elbe, 1983).

2.4 Pengaruh Sukrosa dan Glukosa terhadap Akumulasi Pigmen Betasianin

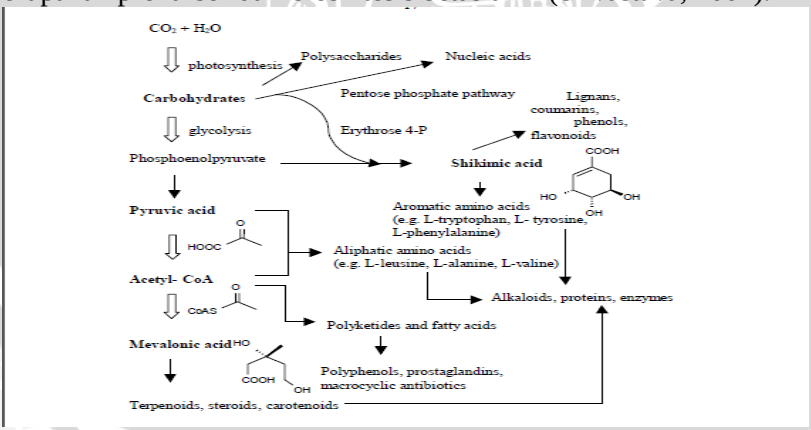
Karbohidrat harus tersedia dalam media kultur karena sangat sedikit sel dari jenis tanaman yang diisolasi dapat bersifat autotropik, yaitu kemampuan menyediakan kebutuhan karbohidrat sendiri melalui asimilasi CO_2 selama proses fotosintesis. Sumber karbohidrat yang sering digunakan dalam media kultur adalah sukrosa. Sukrosa dalam media kultur secara cepat akan dihidrolisis menjadi fruktosa dan glukosa (Soekma, 2009).

Selain sukrosa sumber karbon yang juga sering digunakan sebagai sumber energi untuk kultur jaringan adalah glukosa (Santoso dan Nursandi, 2004). Akumulasi betasianin secara maksimal pada kultur suspensi *Phytolacca americana* dengan medium MS diperoleh dengan penambahan 30 g/l sukrosa (Sakuta dkk., 1987), pada kultur suspensi *Beta vulgaris* pada medium B5 diperoleh dengan penambahan 10 g/l

sukrosa sedangkan dengan medium LS diperoleh dengan penambahan 20 g/l sukrosa (Akita dkk., 2000). Menurut Mizukami, dkk. (1990) pada kultur kalus Rosella *(Hibiscus sabdariffa)* dapat mengakumulasi pigmen anthosianin secara maksimum dengan penambahan glukosa 3% pada medium kultur.

Sukrosa adalah senyawa disakarida dengan rumus molekul $C_{12}H_{22}O_{11}$ (Khan, 2008). Sukrosa dibentuk dari gabungan dua monosakarida yang sederhana yaitu glukosa dan fruktosa. Dalam larutan yang mengandung asam, sukrosa mengalami hidrolisis menghasilkan D-Glukosa dan D-Fruktosa. Glukosa ($C_6H_{12}O_6$, berat molekul 180.18) adalah heksosa monosakarida yang mengandung enam atom karbon. Menurut Soekma (2009) sukrosa adalah sumber energi yang paling baik digunakan untuk kultur jaringan, kemudian glukosa, maltosa, dan rafinosa. Pada umumnya urutan yang demikian berlaku hampir pada semua tanaman. Kultur pucuk mulberry yang tidak dorman, tumbuh baik pada media dengan glukosa sedangkan penambahan sukrosa, tidak merangsang pertumbuhan pucuk.

Sumber karbon adalah salah satu komponen tirosin yang merupakan prekursor dalam proses biosintesis betasianin (Gambar 3). Sumber karbon berupa sukrosa dan glukosa tersebut sangat diperlukan dalam proses biosintesis betasianin, di mana sukrosa akan digunakan dalam proses glikolisis. Phosphoenolpiruvat dan erytrose 4P akan diubah menjadi asam shikimat dan selanjutnya menjadi tirosin yang merupakan prekursor dari biosintesis betasianin (Srivastava, 2002).



Gambar 3. Peran Sumber karbon dalam biosintesis betasianin (Tolonen, 2003)

2.5 Kuantifikasi Betasianin

Betasianin dapat diesktrak dengan menggunakan air atau salah satu pelarut alkoholik (metanol, etanol, n-propanol, 1-butanol, 1-pentanol, sikloheksanol, 1-oktanol dan 1-dodekanol) dan dipisahkan atau dimurnikan dengan kromatografi salah satunya menggunakan HPLC. Metode untuk mendapatkan *crude extract* (ekstrak kasar) dengan pelarut air merupakan metode yang sangat sederhana, efisien dan murah tetapi akan menyulitkan dalam pemisahan antara komponen betasianin dan komponen protein yang larut dalam air. Sedangkan ekstraksi dengan metanol atau senyawa alkoholik lainnya memberikan hasil pemisahan betasianin dan protein yang lebih baik sehingga dapat mengurangi gangguan protein pada analisis betasianin.

Kandungan betasianin total diukur dengan menggunakan spektrofotometer. Kuantifikasi betasianin diawali dengan uji kualitatif Uji kualitatif dilakukan dengan mengukur absorbansi sampel kalus setiap 1 nm pada kisaran panjang gelombang betasianin yaitu 534-554 nm untuk mendapatkan panjang gelombang yang menghasilkan absorbansi maksimum pigmen betasianin pada kalus *C. argentea*. Selanjutnya, panjang gelombang tersebut akan digunakan untuk pengukuran kadar betasianin kalus pada tahap berikutnya.

Analisis kandungan total betasianin pada kalus diukur berdasarkan kandungan amaranthin yaitu salah satu subklas betasianin yang sudah teridentifikasi dominan pada *C. cristata* (Schliemann dkk., 2001). Kandungan total betasianin dari ekstrak kasar *C. argentea* ditentukan dengan metode spektrofotometri, dihitung dan diekspresikan sebagai amaranthin dengan persamaan rumus yang digunakan oleh Cai dkk. (1998):

$$AC_d = \frac{A_{536} \times (MW) \times Vd \times (DF)}{\varepsilon \times L \times W_d} \quad \text{.....(2.1)}$$

Keterangan:

AC_d = Kandungan betasianin dari ekstrak kalus kering (µg/g)
A_{536} = absorbansi pada 536 nm (λ mak)
MW = berat molekul amaranthin (726.6 g/mol)
Vd = volume pelarut (ml)
DF = faktor pengenceran
ε = koefisien ekstensi molar amaranthin = 5.66×10^4 L/mol cm
W_d = berat kering kalus *freeze drying* (g)
L = Tebal kuvet (1.0 cm)

BAB III
METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan mulai Oktober 2010 dan selesai pada bulan Agustus 2011. Pemeliharaan kultur *in vitro* dilaksanakan di Laboratorium Fisiologi Tumbuhan, Kultur Jaringan dan Mikroteknik, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam; Kuantifikasi betasianin secara spektrofotometri dilaksanakan di Laboratorium Kimia Organik, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya; dan pengeringan kalus dengan *freeze drying* dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Jurusan Biologi, Universitas Muhammadiyah Malang, Malang**.**

3.2 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Kelompok faktorial yaitu dengan menggunakan 3 faktor pengamatan yaitu jenis sumber karbon (sukrosa dan glukosa), konsentrasi masing-masing sumber karbon (1%, 2% ,3%, 4%, 5% dan 6%) serta lama kultur selama (fase logaritmik). Masing-masing kombinasi perlakuan sumber karbon diulang sebanyak 3 kali dan dianggap sebagai kelompok.

3.3 Pembuatan Media Kultur

Media kultur yang digunakan terdiri atas empat macam yaitu media perkecambahan, media untuk induksi, pemeliharaan kalus (subkultur) dan media perlakuan sumber karbon. Media dasar yang digunakan untuk empat macam medium tersebut adalah Murashige Skoog (Lampiran 1, tabel 2) dengan perlakuan sumber karbon (Lampiran 2, tabel 4).

Pembuatan media perkecambahan, induksi, dan pemeliharaan kalus diawali dengan mengambil larutan Stok A, B, C, D, E, F, G (Lampiran 2, tabel 3), vitamin, myoinositol dan ZPT (2 ppm NAA + 2 ppm BAP) dimasukkan ke dalam erlenmeyer kemudian ditambahkan gula 30 g/l dan dilakukan pengukuran pH antara 5,5-5,8. Penyesuaian pH dilakukan dengan menambahkan larutan NaOH dan HCl. Kemudian dilakukan penambahan aquades sampai volume yang ditentukan dan ditambahkan agar sebanyak 8 g/l kemudian dihomogenkan dengan menggunakan stirer sambil dipanaskan. Selanjutnya media didinginkan

sampai suhu sekitar 50º- 60ºC dan dimasukkan ke dalam botol kultur masing-masing ± 10 ml. Setelah dimasukkan ke dalam botol kultur, bagian atas botol ditutup dengan plastik dan diikat dengan karet. Media disterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 110°C tekanan 1 atm selama 15 menit. Media yang digunakan untuk perlakuan jenis sumber karbon adalah medium MS dasar dengan penambahan sukrosa dan glukosa masing-masing dengan konsentrasi 1%, 2%, 3%, 4%, 5% dan 6%.

3.4 Perkecambahan Biji Secara in vitro

Perkecambahan biji *Celosia argentea* dilakukan secara *in-vitro* di dalam *Laminar air flow* (LAF) menggunakan media MS0 (tanpa ZPT). Peralatan yang akan digunakan terlebih dahulu disterilkan dengan menggunakan sinar Ultraviolet selama 30 menit. Biji dibungkus kain kasa lalu dimasukkan ke dalam larutan sterilan yang mengandung 30% pemutih (5,25% NaClO) selama 10 menit dan dibilas 3 kali dengan aquades steril masing-masing selama 5 menit. Biji yang telah steril selanjutnya dimasukkan ke dalam botol kultur sebanyak lima biji pada masing-masing botol. Botol kultur yang telah berisi biji steril selanjutnya disimpan di rak kultur dengan suhu 25ºC dan intensitas cahaya 35,39 watt/m^2.

3.5 Induksi dan Pemeliharaan Kalus

Eksplan yang digunakan untuk induksi kalus adalah kotiledon dari kecambah umur 2 minggu hasil perkecambahan biji *C. argentea* secara *in-vitro*. Eksplan tersebut diperoleh dari kotiledon utuh dengan panjang ± 0.5-1 cm dan dimasukkan ke dalam botol kultur yang berisi media induksi kalus. Dalam satu botol kultur diisi 3 potongan kotiledon utuh.

Proses pemeliharaan kalus melalui subkultur yang juga bertujuan seleksi untuk mendapatkan kalus berwarna merah yang selanjutnya akan digunakan untuk mendapatkan kurva pertumbuhan dan untuk tahap perlakuan variasi jenis sumber karbon. Subkultur dimulai dengan mengambil kalus dari botol kultur dan diletakkan di atas cawan petri. Selanjutnya dilakukan pemotongan pada bagian induk eksplan agar muncul kalus dan dimasukkan kembali ke dalam botol kultur. Subkultur dilakukan beberapa kali (3 kali subkultur) hingga kalus berwarna merah. Hasil induksi dan pemeliharaan kalus diinkubasi pada suhu 25ºC dan intensitas cahaya 35,39 watt/m^2.

3.6 Kurva Pertumbuhan

Jika proses subkultur telah menghasilkan kalus berwarna merah, maka dilakukan pembuatan kurva pertumbuhan untuk mengetahui umur kultur pada masing-masing fase pertumbuhan kalus. Pembuatan kurva pertumbuhan dilakukan dengan menimbang berat basah masing-masing kalus setiap 3 hari sekali hingga pertumbuhannya mencapai fase stasioner. Umur kultur pada fase logaritmik selanjutnya digunakan sebagai waktu pengamatan perlakuan sumber karbon.

3.7 Perlakuan medium glukosa dan sukrosa

Kalus berwarna merah dengan berat ± 1 gram dipindahkan dalam media perlakuan yaitu sukrosa dan glukosa dengan konsentrasi 1%, 2%, 3%, 4%, 5% dan 6%. Dalam satu botol kultur diisi 1 potongan kalus, kemudian diinkubasi pada suhu 25ºC dan intensitas cahaya 35,39 watt/m^2.

3.8 Pengamatan morfologi dan pertumbuhan kalus

Pengamatan morfologi dilakukan dengan mengamati perubahan warna kalus setelah dikulturkan dalam perlakuan sumber karbon. Pertumbuhan kalus diketahui dengan melakukan penimbangan berat basah kalus dan berat kering kalus hasil perlakuan pada lama kultur 6 hari, 12 hari dan 18 hari. Berat basah dan berat kering diukur dengan neraca analitik dengan ketelitian 0.001 g. Penimbangan berat kering dilakukan setelah sampel dikeringkan dengan *freeze drying.*

3.9 Kuantifikasi Betasianin

Proses kuantifikasi betasianin diawali dengan uji kualitatif. Uji kualitatif dilakukan untuk mengetahui panjang gelombang yang akan digunakan untuk kuantifikasi betasianin dengan spektrofotometer. Ektraksi betasianin untuk uji kualitatif maupun kuantifikasi betasianin pada kalus *Celosia argentea* dilakukan dengan mengacu metode Silva dkk. (2005). Sampel kalus yang digunakan untuk uji kualitatif maupun kuantifikasi betasianin dikeringkan dengan *freeze drying*. Proses *freeze drying* juga dikenal sebagai *lyophilization,* merupakan metode menghilangkan cairan dengan sublimasi yaitu langsung membekukan cairan. Proses ini berlangsung pada temperatur sangat rendah, sehingga tidak terjadi perubahan enzimatis atau kimia. Sampel kalus yang telah

dikeringkan dengan *freeze drying* kemudian digerus menggunakan mortar dan pastle serta ditambahkan 10 ml metanol 80% dan asam askorbat 50 mM. Setelah diperoleh homogenat selanjutnya dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm selama 10 menit. Untuk uji kualitatif absorbansi supernatan diukur menggunakan spektrofotmeter pada panjang gelombang 534-554 nm. Pertama disiapkan blanko dan sampel yang akan diukur. Selanjutnya spektrofotometer dinyalakan dan dipilih mode 'spektrum'. Kemudian ditera kisaran panjang gelombang dan kisaran absorbansi yang akan digunakan untuk mengukur sampel. Setelah itu blanko dimasukan ke dalam kuvet dan dilakukan kalibrasi. Jika telah muncul tanda '0' pada layar spektrofotometer, kemudian salah satu blanko diganti dengan sampel yang akan diukur dan dipilih 'start'. Selanjutnya panjang gelombang yang menghasilkan absorbansi maksimal sampel akan digunakan untuk pengukuran (kuantifikasi) kadar betasianin pada tahap berikutnya.Kandungan total betasianin pada kalus kering diukur berdasarkan kandungan amaranthin dengan persamaan rumus (2.1)

3.10 Analisis data

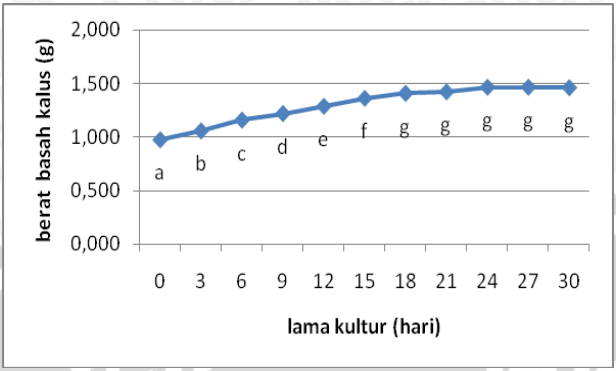
Analisis data kuantitatif dilakukan dengan menggunakan SPSS One Way ANOVA dengan uji lanjutan menggunakan uji Tukey dan uji Gameshowell dengan signifikansi sebesar 5%.

BAB IV
HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Induksi Kalus *Celosia argentea* dan Kurva Pertumbuhan.

Celosia argentea merupakan salah satu spesies ~~yang~~ berbunga merah yang berpotensi menghasilkan pewarna alami untuk makanan, obat dan kosmetik (Georgiev, 2008). Adanya kemajuan teknologi saat ini pewarna alami tersebut dapat diperoleh dengan menggunakan teknik kultur jaringan yaitu melalui kultur kalus. Respon induksi kalus *C. argentea* dengan menggunakan eksplan kotiledon pada media induksi ditandai dengan terjadinya pembengkakan eksplan yang menyebabkan eksplan mengalami penambahan ukuran dibandingkan sebelum diinduksi. Hal ini sesuai dengan pernyataan Stafford dan Warren (1991), yang menyatakan bahwa inisiasi kalus dapat diketahui dengan terjadinya pembengkakan pada area yang mengalami pelukaan. Pembengkakan terjadi satu minggu setelah induksi. Kalus *C. argentea* mulai terbentuk dua minggu setelah terjadi pembengkakan pada eksplan yaitu ditandai dengan munculnya tonjolan-tonjolan kecil pada daerah yang terluka. Seleksi kalus warna merah yang menunjukkan keberadaan betasianin dilakukan dengan perlakuan subkultur tiap dua minggu sekali.

Kalus yang berwarna merah ditimbang berat basahnya setiap 3 hari selama 30 hari untuk menentukan kurva pertumbuhan (Gambar 4). Kurva pertumbuhan tersebut berfungsi untuk mengetahui waktu masing-masing fase pada pertumbuhan kalus *C. argentea* yang menunjukkan bahwa akumulasi betasianin secara maksimum yaitu pada fase logaritmik. Kondisi kalus berbeda pada tiap tahapan pertumbuhan yaitu (1) fase lag, dimana sel dalam mulai membelah, aktivitas pembelahan masih perlahan karena masih dalam proses adaptasi.; (2) fase logaritmik, dimana terjadi pembelahan sel maksimal karena berada pada kondisi nutrisi yang mencukupi dengan jumlah sel yang sebanding; (3) fase stasioner atau tidak ada pertumbuhan, jumlah sel konstan.



Gambar 4. Pertumbuhan kalus *C. argentea* pada medium pemeliharaan selama 30 hari. Keterangan : Huruf yang berbeda pada lama kultur yang berbeda menunjukkan beda nyata berdasarkan uji Tukey ($\alpha = 0,05$)

Pertumbuhan kalus selama 30 hari meningkat secara signifikan dari awal kultur (hari ke 0) hingga mencapai hari ke 18 (Lampiran 3, tabel 5). Fase lag pada kurva pertumbuhan tersebut tidak terlihat karena berat basah kalus meningkat secara signifikan pada awal kultur yaitu pada hari ke-0 (0.978 g) dan hari ke-3 (1,061 g). Diduga bahwa fase lag tersebut terjadi secara singkat yaitu antara hari ke-0 sampai hari ke-2 lama kultur. Sedangkan fase log yang ditunjukkan dengan peningkatan berat basah yang signifikan terjadi dari hari ke-3 sampai dengan hari ke-18 (1.410 g). Sedangkan pada hari ke-21 (1.425 g) kalus memasuki fase stasioner awal karena meskipun mengalami peningkatan berat basah dibandingkan hari ke-18, namun peningkatan yang terjadi pada hari ke-21 tidak berbeda secara signifikan.

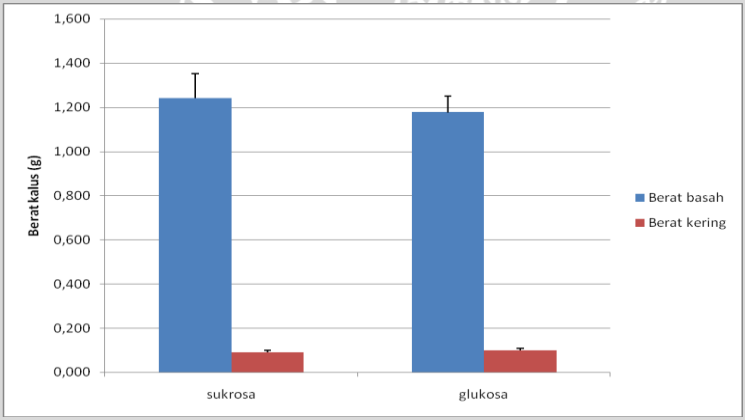
Menurut Hirose dkk. (1990) dan Akita (2000), sintesis betasianin optimum terjadi ketika pembelahan sel maksimal atau pada fase logaritmik. Berdasarkan hasil kurva pertumbuhan, waktu pengamatan parameter pertumbuhan dan kandungan betasianin kalus *C. argentea* pada media perlakuan sukrosa dan glukosa dilakukan pada hari ke 6, 12 dan 18.

4.2 Pengaruh sukrosa dan glukosa terhadap Pertumbuhan Kalus *Celosia argentea*

Secara umum pertumbuhan kalus dengan perlakuan medium sukrosa dan glukosa pada fase logaritmik mengalami peningkatan berat

basah dan berat kering pada hampir semua lama kultur. Hasil analisis ragam (Lampiran 5, Tabel 11) menunjukkan bahwa berat basah kalus hanya dipengaruhi oleh lama kultur (LH) (Lampiran 5, Tabel 12). Analisis ragam (Lampiran 5, Tabel 13) juga menunjukkan bahwa berat kering kalus–hanya dipengaruhi oleh lama kultur (LH) (Lampiran 5, Tabel 14).

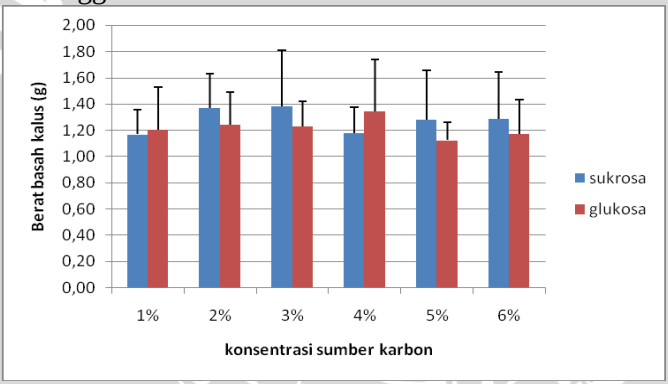
Pada penelitian ini menunjukkan bahwa jenis sumber karbon yang berbeda menghasilkan berat basah dan berat kering kalus *C. argentea* yang tidak berbeda. Penambahan sukrosa cenderung menghasilkan berat basah yang lebih tinggi (1,240 g) dibandingkan glukosa (1,177 g) (Gambar 5). Namun sebaliknya glukosa cenderung menghasilkan berat kering lebih tinggi (0,099 g) dari sukrosa (0,091 g) (Gambar 5). Sukrosa selain berpotensi dalam menghasilkan energi untuk metabolisme primer, juga mempunyai kemampuan dalam mempertahankan potensial air dalam jaringan sehingga kalus dengan perlakuan sukrosa cenderung mempunyai berat basah yang lebih tinggi dibandingkan berat basah pada perlakuan glukosa. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Sakuta dkk (1987) akumulasi betasianin pada *Phytolacca americana* berdasarkan berat basah kalus mempunyai hasil yang konstan dengan menggunakan konsentrasi sukrosa lebih dari 88 mM.



Gambar 5. Pengaruh jenis sumber karbon terhadap berat basah dan berat kering kalus *C. argentea.*

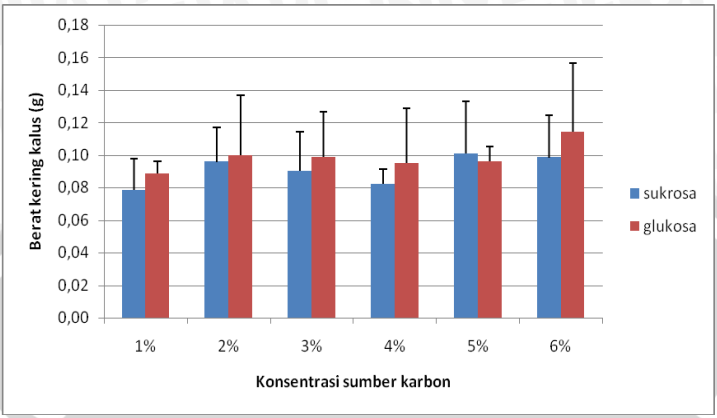
Konsentrasi sukrosa dan glukosa yang diujikan menghasilkan berat basah kalus *C. argentea* yang tidak berbeda nyata. Berat basah

kalus pada medium sukrosa 2%, 3% dan glukosa 4% tidak berbeda nyata dan cenderung lebih tinggi dibanding perlakuan konsentrasi yang lain, masing-masing 1,370 g, 1,384 g dan 1,342 g (Gambar 6). Berat basah kalus cenderung lebih rendah pada medium dengan konsentrasi sukrosa lebih dari 3% dan kurang dari 2% atau pada medium dengan konsentrasi glukosa lebih dari 4% dan kurang dari 2%. Hal tersebut diduga bahwa semakin tinggi konsentrasi sumber karbon dalam medium (lebih dari 3%) maka akan menurunkan berat basah kalus dan semakin rendah (kurang dari 2%) penambahan sumber karbon dalam medium juga menyebabkan penurunan berat basahnya. Hal tersebut disebabkan metabolisme sumber karbon pada kalus yang dikulturkan pada konsentrasi tinggi dan rendah belum maksimal.



Gambar 6. Pengaruh konsentrasi sumber karbon terhadap berat basah kalus *C.argentea*.

Konsentrasi sukrosa dan glukosa juga menghasilkan berat kering kalus *C. argentea* yang tidak berbeda. Berat kering kalus pada medium sukrosa 2%, 5% dan 6% serta glukosa 2%, 3%, 5% da 6% cenderung lebih tinggi diantara perlakuan yang lain (Gambar 7). Berat kering kalus dengan perlakuan sukrosa cenderung mengalami peningkatan pada konsentrasi yang tinggi yaitu pada konsentrasi 5% dan 6%. Hal yang sama juga terjadi pada medium perlakuan glukosa bahwa semakin tinggi konsentrasi dapat meningkatkan berat kering kalus, namun pada glukosa 2% dan 3% mempunyai berat kering yang sama dengan glukosa 5% dan 6%.

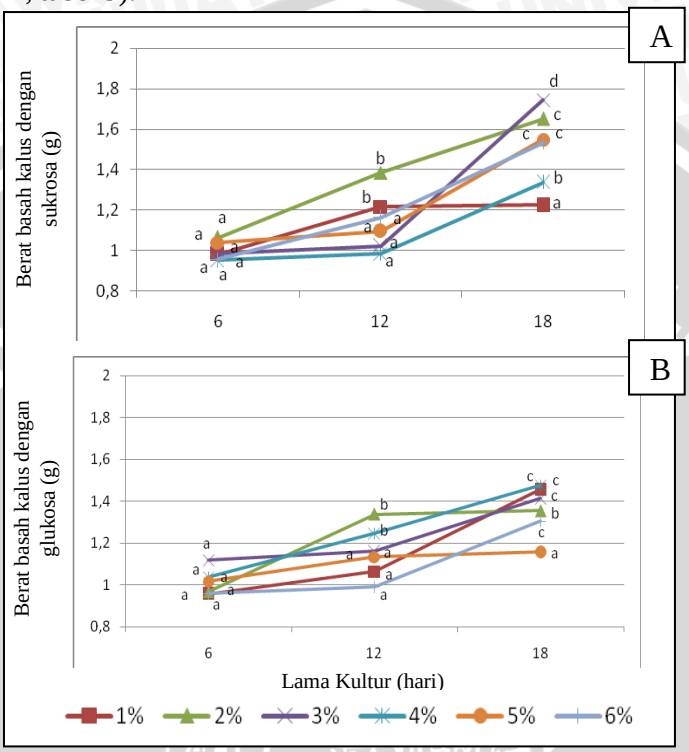


Gambar 7. Pengaruh konsentrasi sumber karbon terhadap berat kering kalus *C.argentea.*

Baik jenis maupun konsentrasi sumber karbon menghasilkan berat basah dan berat kering kalus *C. argentea* yang tidak berbeda nyata namun pada perlakuan sukrosa cenderung mempunyai berat basah lebih tinggi dibandingkan perlakuan glukosa. Hal ini diduga jenis sumber karbon dan konsentrasi yang digunakan dalam medium perlakuan mempunyai pengaruh sama dalam aktivitas sintesis metabolit primer. Penelitian yang dilakukan Francoise dkk. (2007) dengan menggunakan konsentrasi glukosa 1% hingga 9% juga belum mempengaruhi pertumbuhan dari kalus *Zataria multiflora* meskipun menunjukkan kecenderungan terjadinya peningkatan berat basah, karena peningkatan pertumbuhan kalus pada konsentrasi 1% - 9% hanya mengalami peningkatan antara 0.067 g - 0.084 g.

Berat basah kalus dipengaruhi lama kultur secara signifikan. Kalus yang dikulturkan selama 12 hari tidak mengalami peningkatan berat basah yang signifikan pada medium dengan sukrosa (Gambar 8A) dan glukosa (Gambar 8B). Peningkatan berat basah kalus pada medium sukrosa dan glukosa yang signifikan terjadi pada lama kultur 18 hari. Peningkatan BB kalus yang paling tinggi dan signifikan (0.721 g) diperoleh dari hari ke 12 (1,023 g) hingga hari ke 18 (1.744 g) pada medium dengan penambahan sukrosa 3%. Pada lama kultur tersebut perlakuan sumber karbon yang lain hanya menyebabkan peningkatan BB signifikan sebesar 0.2 – 0.4 g. Sedangkan berat basah kalus pada

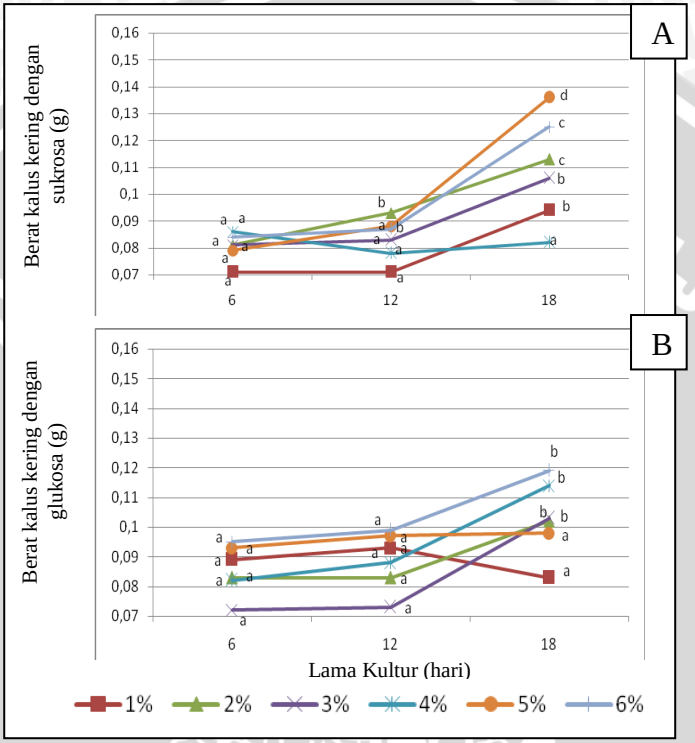
sukrosa 1% tidak mengalami peningkatan namun cenderung menurun (Lampiran 4, tabel 9).



Gambar 8. Pengaruh lama kultur terhadap berat basah kalus *C. argentea*. A. pada medium dengan penambahan sukrosa, B. pada medium dengan penambahan glukosa. Keterangan: Huruf kecil yang berbeda pada konsentrasi yang sama; pada lama kultur yang berbeda menunjukkan beda nyata berdasarkan uji Gameshowell ($\alpha = 0{,}05$).

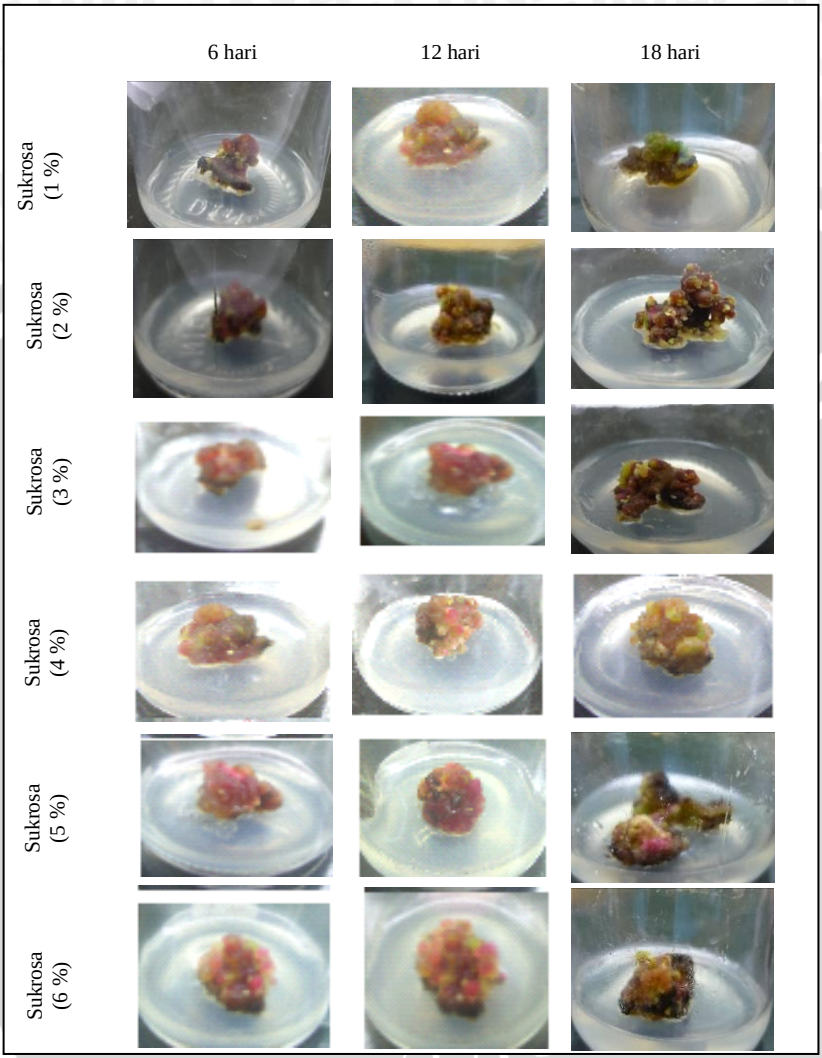
Pertumbuhan kalus berdasarkan berat kering juga dipengaruhi lama kultur secara signifikan. Kalus yang dikulturkan selama 12 hari tidak mengalami peningkatan berat kering yang signifikan (Gambar 9A). Pada lama kultur 18 hari peningkatan berat kering kalus yang signifikan terjadi pada medium sukrosa dan glukosa. Peningkatan berat kering kalus yang paling tinggi dan signifikan (0.04 g) diperoleh dari hari ke 12 (0,088 g) hingga hari ke 18 (0,136 g) pada medium dengan

penambahan sukrosa 5%. Pada lama kultur tersebut perlakuan sumber karbon yang lain hanya menyebabkan peningkatan berat kering signifikan sebesar 0.02 – 0.03 g. (Lampiran 4, tabel 7)

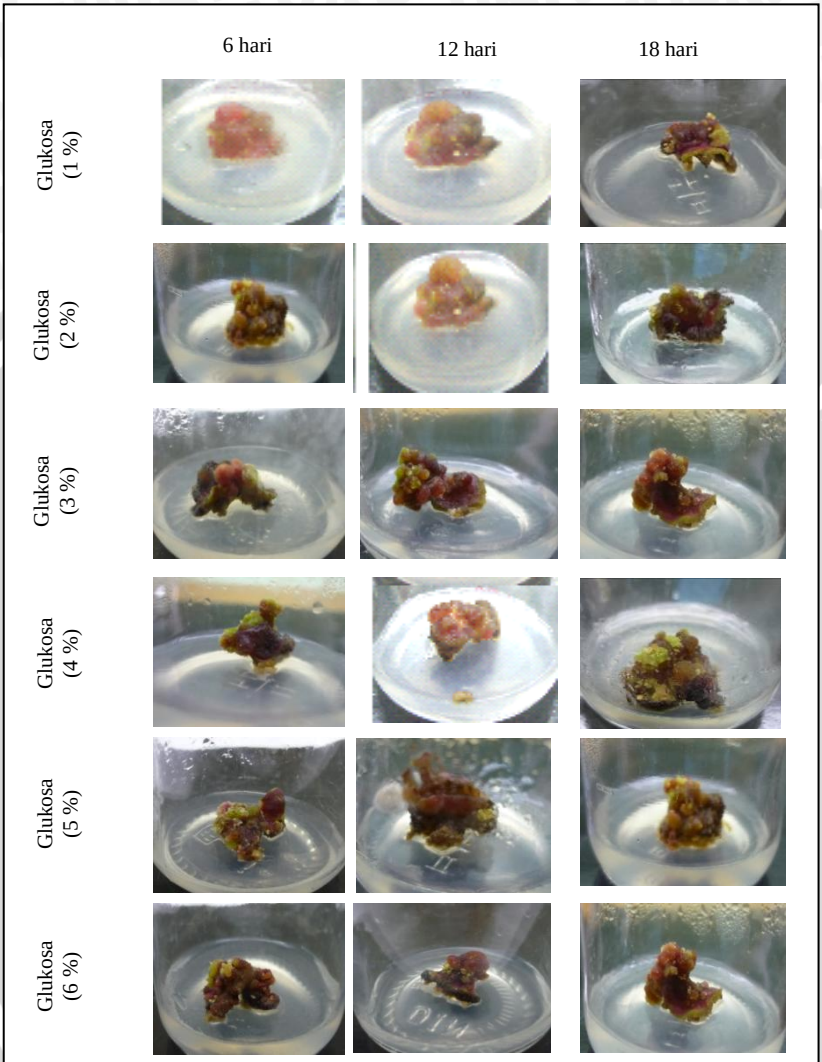


Gambar 9. Pengaruh lama kultur terhadap berat kering kalus *C. argentea*. A. pada medium dengan penambahan sukrosa, B. pada medium dengan penambahan glukosa. Keterangan : Huruf kecil yang berbeda pada konsentrasi yang sama; pada lama kultur yang berbeda menunjukkan beda nyata berdasarkan uji Gameshowell ($\alpha = 0{,}05$).

Pengamatan visual terhadap morfologi berdasarkan warna merah-keunguan pada kalus *C. argentea* menunjukkan bahwa perlakuan sukrosa dan glukosa tidak berpengaruh terhadap perubahan warna merah-ungu pada kalus (Gambar 10, 11). Pada konsentrasi 1-6% pada jenis sumber karbon yang berbeda tidak menunjukkan perbedaan warna kalus.



Gambar 10. Pengaruh perlakuan Sukrosa dan Lama Kultur terhadap Morfologi Kalus *C. argentea*



Gambar 11. Pengaruh perlakuan Glukosa dan Lama Kultur terhadap Morfologi Kalus *C. argentea*

Lama kultur 12 hari belum menunjukkan peningkatan BB kalus yang signifikan bila dibandingkan dengan BB kalus pada lama kultur 6 hari. Hal ini diduga bahwa pertumbuhan yang lambat selama kultur 12

hari tersebut disebabkan karena penggunaan sukrosa sebagai sumber energi untuk proses metabolisme primer belum maksimal. Menurut Pavlov dkk. (2005) bahwa pada penelitiannya dalam mengultivasikan akar beet pada medium MS dengan 30g/l sukrosa mendapatkan pertumbuhan sel yang maksimum pada hari ke 15 kultivasi yaitu 1,4 g/botol pada berat keringnya. Hal ini diduga bahwa pada lama kultur 12 hari sel belum menunjukkan penggunaan sukrosa sebagai sumber energi karena adanya metabolisme primer yang belum aktif dalam memicu pertumbuhannya.

Menurut Ikeda dkk. (1977), waktu optimum dalam pertumbuhan sel merupakan waktu dimana sel memiliki jumlah optimum energi yang berpotensi untuk memicu viabilitas sel dalam merespon pertumbuhan sel tersebut. Pertumbuhan kalus *Celosia* yang meningkat secara signifikan pada lama kultur 18 hari, menunjukkan bahwa penggunaan sukrosa dan glukosa secara optimum sebagai sumber energi bagi pertumbuhan sel terjadi pada lama kultur 18 hari. Hal ini disebabkan sumber karbon berperan maksimal dalam pertumbuhan kalus *C. argentea* sebagai dampak adanya sukrosa dan glukosa dalam medium tersebut.

Peningkatan berat basah dan berat kering kalus *C. argentea* menunjukkan peningkatan metabolit primer yang dihasilkan, sedangkan warna merah-ungu pada kalus menunjukkan pigmen betasianin yang dihasilkan. Adanya perlakuan medium sukrosa dan glukosa belum mempengaruhi pertumbuhan, sedangkan berdasarkan pengamatan visual juga tidak menunjukkan perbedaan terhadap pengamatan warna merah-ungu kalus. Hal ini diduga karena metabolisme primer dalam sel tersebut belum aktif dan juga belum digunakan secara maksimal sehingga sel tersebut belum menggunakan sukrosa dan glukosa dalm pertumbuhannya.

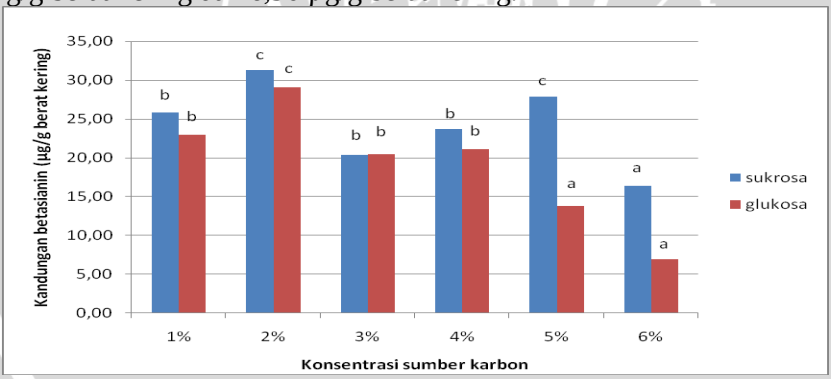
4.3 Pengaruh Sukrosa dan Glukosa terhadap Kandungan Betasianin kalus *Celosia argentea*

Hasil uji kualitatif menunjukkan bahwa pada ekstrak kalus *C. argentea* yang diukur terdapat kandungan pigmen betasianin. Hasil absorbansi maksimum ekstrak kalus *C. argentea* diperoleh pada panjang gelombang 536 nm (Gambar 15, Lampiran 6, tabel 18).

Berdasarkan analisis ragam (Lampiran 5, tabel 15) kandungan betasianin kalus *C. argentea* hanya dipengaruhi oleh konsentrasi

sumber karbon (K) (Lampiran 5, tabel 17) dan interaksi antara jenis sumber karbon (SB) dan lama kultur (LH).

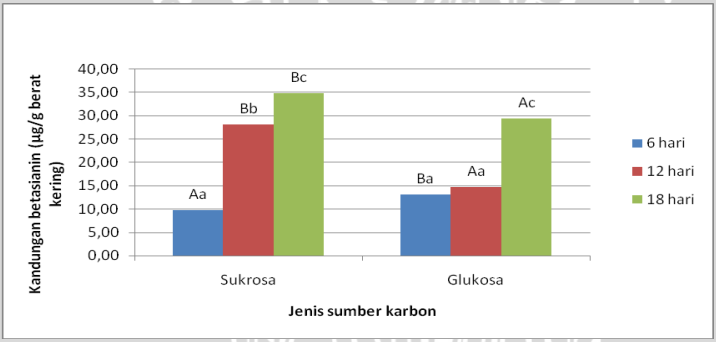
Kandungan betasianin dipengaruhi oleh konsentrasi sumber karbon. Kandungan betasianin yang berbeda nyata diperoleh pada perlakuan sukrosa 2% (31,28 µg/g berat kering), 4% (23,72 µg/g berat kering) dan 6% (16,09 µg/g berat kering) serta glukosa 2% (29,12 µg/g berat kering), 4% (21,14 µg/g berat kering) dan 6% (6,90 µg/g berat kering) (Gambar 13). Sedangkan kandungan betasianin yang tidak berbeda nyata diperoleh dari perlakuan sukrosa dan glukosa masing-masing dengan konsentrasi 1%, 3% dan 5%. Kandungan betasianin paling tinggi pada medium sukrosa dan glukosa diperoleh pada konsentrasi 2% masing-masing sebesar 31,28 µg/g berat kering dan 29,12 µg/g berat kering. Kandungan betasianin mengalami penurunan jika kalus *C. argentea* dikultur pada sukrosa dan glukosa dengan konsentrasi lebih atau kurang dari 2%. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Ikeda dkk. (1977) yang menyatakan bahwa konsentrasi 2% sukrosa pada medium MS dapat meningkatkan 90% lebih tinggi pada produksi *ubiquinonene* pada kultur suspensi tobacco dibandingkan pada medium dasar (Sukrosa 3%). Konsentrasi sukrosa dan glukosa paling tinggi (6%) menghasilkan kandungan betasianin signifikan paling rendah dibandingkan yang lain masing-masing 16,39 µg/g berat kering dan 6,90 µg/g berat kering.



Gambar 12. Pengaruh konsentrasi sumber karbon terhadap kandungan betasianin kalus *C.argentea*. Keterangan: huruf kecil yang berbeda pada konsentrasi yang berbeda pada jenis sumber karbon yang sama menunjukkan beda nyata berdasarkan uji Gameshowell (α = 0,05)

Pada penelitian ini menunjukkan bahwa kandungan betasianin dipengaruhi interaksi antara jenis sumber karbon dan lama kultur (Gambar 13). Sumber karbon sukrosa yang ditambahkan menyebabkan produksi betasianin yang berbeda signifikan pada ketiga lama kultur, masing-masing 9,81 µg/g berat kering, 28,09 µg/g berat kering dan 34,84 µg/g berat kering. Sedangkan sumber karbon glukosa memproduksi betasianin yang tidak berbeda signifikan pada lama kultur 6 dan 12 hari. Namun apabila dikulturkan selama 18 hari penambahan glukosa sebagai sumber karbon meningkatkan kandungan betasianin secara signifikan (29, 40 µg/g berat kering).

Kandungan betasianin paling tinggi pada medium sukrosa dan glukosa diperoleh dari kalus yang dikulturkan selama 18 hari masing-masing sebesar 34,84 µg/g berat kering dan 29,40 µg/g berat kering (Gambar 13). Hal tersebut diduga bahwa sukrosa mapun glukosa digunakan sebagai sumber karbon untuk mensintesis tirosin yang merupakan prekursor metabolit sekunder terjadi secara maksimum pada lama kultur 18 hari. Sedangkan pada lama kultur 6 hari dan 12 hari pada medium glukosa belum terjadi metabolisme yang aktif sehingga kandungan betasianin yang dihasilkan juga lebih sedikit dibandingkan pada lama kultur 18 hari



Gambar 13. Pengaruh interaksi jenis sumber karbon dan lama kultur terhadap kandungan betasianin kalus *C.argentea.* Keterangan: huruf kecil yang berbeda pada lama kultur yang berbeda pada jenis sumber karbon yang sama menunjukkan beda nyata berdasarkan uji Gameshowell (α = 0,05) dan huruf kapital yang berbeda pada sumber karbon yang berbeda pada lama kultur yang sama menunjukkan beda nyata

Kandungan betasianin berbeda nyata pada lama kultur 6 hari, 12 hari dan 18 hari pada medium sukrosa dan glukosa. Kalus yang dikulturkan selama 6 hari pada medium glukosa menghasilkan kandungan betasianin yang lebih tinggi dibandingkan medium sukrosa. Sedangkan kalus yang dikulturkan selama 12 hari dan 18 hari pada medium sukrosa menghasilkan kandungan betasianin yang lebih tinggi dibandingkan medium glukosa. Hal ini diduga bahwa sukrosa mempunyai potensi yang lebih baik dari glukosa sebagai sumber karbon untuk memacu prekursor betasianin setelah dikulturkan selama 12 hari.

Menurut Mizukami dkk. (1991) bahwa glukosa mempunyai kefektifan yang sama dengan sukrosa dalam produksi anthosianin namun sukrosa lebih efektif untuk pertumbuhan sel dari pada glukosa. Peningkatan konsentrasi sukrosa diatas 2-3% secara normal digunakan dalam medium dasar dilaporkan untuk meningkatkan produksi komponen fenol, termasuk anthosianin. Berbeda halnya pada penggunaan glukosa dan sukrosa dalam produksi betasianin dari kalus *C. argentea*, di mana sukrosa mempunyai kemampuan yang lebih efektif dibandingkan glukosa. Hal tersebut diduga bahwa peristiwa metabolisme sekunder yang didukung oleh sukrosa lebih baik dari pada glukosa karena menurut Soekma (2009) bahwa sukrosa merupakan sumber karbon terbaik untuk kultur jaringan karena dapat digunakan sebagai sumber energi.

BAB V
KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Pertumbuhan kalus *C. argentea* hanya dipengaruhi oleh lama kultur; kandungan betasianin dipengaruhi konsentrasi sumber karbon dan interaksi lama kultur dengan jenis sumber karbon.

Pertumbuhan kalus *C. argentea* berdasarkan berat basah dan berat kering pada fase logaritmik (6, 12 dan 18 hari hanya dipengaruhi oleh lama kultur. Pertumbuhan kalus optimal diperoleh pada lama kultur 18 hari yaitu mencapai berat basah sebesar 1,744 g dan berat kering sebesar 0,136 g dibandingkan lama kultur 6 dan 12 hari pada perlakuan sukrosa maupun glukosa

Kandungan betasianin pada fase logaritmik (6, 12 dan 18 hari) hanya dipengaruhi oleh konsentrasi sumber karbon dan interaksi antara lama kultur dan jenis sumber karbon. Kandungan betasianin tertinggi (31,2 µg/g berat kering) dihasilkan pada konsentrasi 2%. Kalus yang dikulturkan selama 18 hari pada medium sukrosa menghasilkan kandungan betasianin yang paling tinggi dibandingkan pada medium glukosa.

5.2 Saran

Untuk mendapatkan betasianin secara maksimal dari kalus *Celosia argentea* dapat dikulturkan pada medium dasar MS dengan penambahan hormon 2 ppm NAA dan 2 ppm BAP dan sumber karbon sukrosa dengan konsentrasi 2% selama 18 hari.

DAFTAR PUSTAKA

Akita, T., Y. Hina dan T. Nishi. 2000. Production of Betacyanins by a Cell Suspension Culture of Table Beet (*Beta vulgaris* L.). Bioscience Biotechnology Biochemistry. 64 (9): 1807-1812

Allegra, M., Furtmuller, P. G., Jantschko, W., Zederbauer, M., Tesoriere, L., Livrea, M. A. dan Obinger, C. 2005. Mechanism of Interaction of Betanin and Indicaxanthin with Human Myeloperoxidase and Hypochlorous acid. Biochemistry Biophysich Community. 332: 837–844.

Arokiraj, L. 2003. Production of Useful Plant Metabolite, In: Fietcher, A. (Eds). Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology. Springer-Verlag. London. pp. 34-65.

Cai, Y. M. Sun, H. Wu, R. Huang, dan H. Corke. 1998. Characterization and Quantification of Betacyanin Pigments from Diverse *Amaranthus* Species. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 46 (6): 2063-2070

Cai, Y., M. Sun, dan H. Corke. 2005. Characterization and Application of Betalain Pigments from Plants of the Amaranthaceae. Trends Food Science & Technology. 16 (9): 370-376.

Chawla, H. S. 2002. Introduction to Plant Biotechnology Second Edition. Science Publisher Inc. USA

Christinet, L. 2004. Characterization and Functional Identification of a Novel Plant Extradiol 4.5-dioxygenase Involve in Betalain Pigment Biosynthesis in *Portulaca grandiflora*, PhD thesis. Universite de Laussane. Departement de Biologie Moleculaire Vegetale.

Fowler, M. W. 1983. Commercial Applications and Economic Aspects of Mass Plant-cell Culture. In: Mantel SH, Smith H (eds) Plant Biotechnology. Cambridge University Press. Cambridge.

Francoise, B., Hossein, S., Halimeh, H. dan Zahra, N. F. 2007. Growth Optimization of *Zataria multiflora* Boiss. Tissue Cultures and Rosmanic acid Production Improvement. Pakistan Journal of Biological Sciences. 10 (19): 3395-3399

Galati, E. M., Mondello, M. R., Lauriano, E. R., Taviano, M. F., Galluzzol, M. dan Miceli, N. 2005. *Opuntia ficus indica* (L.) Mill. Fruit Juice Protects Liver from Carbon Tetrachlorideinduced Injury. Phytotherity Resume. 19: 796–800

Grotewold, E. 2006. The Genetics and Biochemistry of Floral Pigments. Annual Reviews of Plant Biology. 57: 761-780.

Georgiev, V., M. Ilieva, T. Bley dan A. Pavlov. 2008. Betalain Production in Plant in Vitro System. Acta Physiology Plant. (19): 1-11

Han, X., Z. Gao dan X. Xiao. 2009. Enzymes and Genes Involve in the Betalain Biosyntesis in Higher Plants. African Journal Biotechnology. 8: 6735-6744.

Hirose, M., T. Yamakawa, T. Kodoma dan Komamine. 1990. Accumulation of Betacyanin in *Phytolacca Americana* Cell and of Anthocyanin in *Vitis* sp. Cell in Relation to Cell Division in Suspension Culture. Plant Celluler Physiology. 2: 267-271.

Ikeda, T., Takashi, M., dan Masao, M. 1977. Effects of Inorganic Nitrogen Sources and Physical Factors on the Formation of Ubiquinone by Tobacco Plant Cell in Suspension Culture. Agriculture Biology Chemistry. 41 (7): 1197-1201.

Kapadia, G. J., Tokuda, H., Konoshima, T. dan Nishino, H. 1996. Chemoprevention of Lung and Skin Cancer by *Beta vulgaris* (beet) root Extract. Cancer Letter. 100: 211–214

Khan, R. 2008. Sukrosa dan Sifatnya. http://www.risvank.com/2008/05/sukrosa-dan-sifatnya/. Tanggal akses 24 Mei 2010.

Misawa, M. 1985. Production of Useful Plant Metabolite, In: Fietcher, A. (Eds), Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology. Springer-Verlag. Berlin. pp. 59-88.

Mizukami, H., Miki, N., Kaomi, T., Kaori H. dan Hiromu, O. 1991. Effect of Macronutrient on Anthosyanin Production in Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) Callus Cultures. Plant Tissue Culture Letters. 8 (1): 14-20

Moreno, D. A., C. G. Viguera, J. I. Gil dan A. G. Izquierdo. 2008. Betalains in the Era of Global Agri-food Science, Technology and Nutritional Health. Phytocemistry Review. 7 (2): 261-280.

Pavlov, A., Georgiev, V. dan Ilieva, M. 2005. Betalain Biosynthesis by Red beet (*Beta vulgaris* L). Hairy root Culture. Process Biochemistry. 40: 1531-1533

Sakuta, M., T. Takagi dan A. Komamine. 1987. Effect of Sucrose on Betacyanin Accumulation and Growth in Suspension Culture of *Phytolacca americana*. Physiologia plantarum. 71: 455-458

Schliemann, W., Y. Cai, T. Degenkolb, J. Schmidt dan H. Corke. 2001. Betalains of *Celosia argentea*. Phytochemistry. 58 (1): 159-65.

Schwartz, S. J, dan Von, E. J. H. 1983. Inability of Red beet Betalain Pigments to Initiate or Promote Hepatocarcinogenesis. Food Chemistry Toxicology. 21: 531–535

Silva, J. A. T. 2004. The Effect of Carbon Source on *in vitro* Organogenesis of Chrysanthemum Thin Cell Layers. Physiologia plantarum. Vol.63 no.2 Campinas

Silva, N. C. B., Andrea, F. M., Celso, L. S. L., Maria, A. E. dan Alice, S. 2005. Developmental Effects of Additional Ultraviolet a Radiation, Growth Regulators and Tyrosine in *Alternanthera brasiliana* (l.) Kuntze Cultured *in vitro*. Brazilian Archives of Biology and Technology. 48: 779-786

Soekma, P. 2009. Kultur Jaringan. http://www.panjisoekma.blogspot.com/9/kulturjaringan.html. Tanggal akses 18 Maret 2010.

Sreekanth, D., Arunasree, M. K., Roy, K. R., Chandramohan, T., Reddy, G.V. dan Reddanna, P. 2007. Betanin a Betacyanin Pigment Purified from Fruits of *Opuntia ficus-indica* Induces Apoptosis in Human Chronic Myeloid Leukemia Cell Line-K562. Phytomedicine. 14: 739–746

Srivastava, L. M. 2002. Plant Growth and Development, Hormones and Environment. Academic Press. San Diego. California

Stafford, A. dan G. Warren. 1991. Plant Cell and Tissue Culture. John Willey and Sons inc. New York.

Stintzing, F. C dan Carle, R. 2007. Betalains Emerging Prospets for Food Sciences. Trends Food Scicence Technology. 18: 514–525

Strack, D., T. Vogt dan W. Schliemann. 2003. Recent Advances in Betalain Research. Phytochemistry. 62: 247-269

Tolonen, A. 2003. Analysis of Secondary Metabolites in Plant and Cell Culture Tissue of *Hypericum Perforatum* L and *Rhodiola Rosea* L. Oulu University Press. Oulu Finland

Zryd, J. P. dan L. Christenet. 2004. Betalain, in Plant Pigments and Their Manipulation, Editor: Davies K., Ann. Plant Reviews. CRC Press. Blackwell Publication. 185-213

Lampiran 1. Komposisi Medium Dasar MS (Murashige dan Skoog)

Tabel 2. Komposisi Medium Dasar MS (Murashige dan Skoog)

Komponen	Nama Bahan	Berat (mg/L)
Makronutrien	KNO_3	1900
	NH_4NO_3	1650
	$CaCl_2.2H_2O$	440
	$MgSO_4.7H_2O$	370
	KH_2PO_4	170
Mikronutrien	$MnSO_4.4H_2O$	22,3
	$ZnSO_4.7H_2O$	8,6
	H_3BO_3	6,2
	Kl	0,83
	$Na_2MoO_4.2H_2O$	0,25
	$CuSO_4.5H_2O$	0,025
	$CoCl_2.6H_2O$	0,025
	$FeSO_4.7H_2O$	27,8
Vitamin MS	Thiamin-HCl	0,1
	Nicotin acid	0,5
	Pyridoxine HCl	0,5
	Glycin	2
Myo-inositol	Myo-Inositol	100
Sukrosa		30000
pH 5,5 – 5,8		

Lampiran 2. Komposisi Larutan Stok Media MS, Penentuan Berat Sukrosa dan Glukosa dan perhitungan larutan pengencer

Tabel 3. Komposisi Larutan Stok Media MS dengan Volume 100 mL

Larutan Stok	Nama Bahan	Berat untuk 100 ml (g)	Pengambilan untuk 1 L media (ml)
A	NH_4NO_3	8.25	20
B	KNO_3	9.5	20
C	$CaCl_2.2H_2O$	4.4	10
D	$MgSO_4.7H_2O$ KH_2PO_4	3.7 1.7	10
E	$FeSO_4.7H_2O$ $Na_2EDTA.2H_2O$	0.56 0.75	5
F	H_3BO_3 $MnSO_4.4H_2O$ $ZnSO_4.7H_2O$	0.12 0.446 0.17	5
G	KI $Na_2MoO_4.2H_2O$ $CuCl_2.6H_2O$ $CoSO_4.7H_2O$	0.2 0.05 0.005 0.005	0.5
Vitamin MS	Nicotinic Acid Pyridoxine HCl Thiamin HCl	0.1 0.1 1	1
Myo-Inositol	Myo-Inositol	1	10
Zat Pengatur Tumbuh	NAA BAP	0.4 0.2	1 ml untuk 1 ppm

Tabel 4. Penentuan berat sukrosa dan glukosa yang dilarutkan dalam 1 L media MS

Konsentrasi sukrosa dan glukosa (%)	Penambahan untuk 1 L MS (g)
1	**10**
2	**20**
3	**30**
4	**40**
5	**50**
6	**60**

Cara perhitungan larutan asam askorbat 50 mM dalam 100 ml Metanol 80%

Mr As. Askorbat = 176,13

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

= 8,8065 g/L

$\frac{80}{100}$ x 100 = 80 ml metanol + 20 ml aquades = 100 ml metanol 80%

Dalam 100 mL As. Askorbat 50 mM

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

Lampiran 3. Rata-rata Berat kalus basah sebagai hasil kurva pertumbuhan

Tabel 5. Rata-rata Berat kalus basah sebagai hasil kurva pertumbuhan

hari ke	berat basah (g) ± SD (n=5)
0	0,978 ± 0,051
3	1,061 ± 0,089
6	1,161 ± 0,064
9	1,222 ± 0,108
12	1,290 ± 0,076
15	1,364 ± 0,034
18	1,410 ± 0,057
21	1,425 ± 0,043
24	1,467 ± 0,072
27	1,467 ± 0,038
30	1,463 ± 0,057

Lampiran 4. Pertumbuhan Kalus dan Kandungan Betasianin

Tabel 6. Rata-rata pertumbuhan kalus (g) dengan medium sukrosa ± SD (n=3)

Lama kultur (hari)	Konsentrasi sukrosa	Berat basah (g) ± SD (n=3)	Berat kering (g) ± SD (n=3)
6	1%	0,983 ± 0,038*a	0,071 ± 0,019*a
	2%	1,065 ± 0,064*a	0,081 ± 0,021*a
	3%	0,984 ± 0,074*a	0,081 ± 0,023*a
	4%	0,993 ± 0,096*a	0,086 ± 0,008*a
	5%	1,039 ± 0,074*a	0,079 ± 0,031*a
	6%	0,997 ± 0,057*a	0,084 ± 0,025*a
12	1%	1,217 ± 0,065*b	0,071 ± 0,021*a
	2%	1,385 ± 0,043*b	0,093 ± 0,009*b
	3%	1,023 ± 0,064*a	0,083 ± 0,002*a
	4%	1,074 ± 0,071*a	0,078 ± 0,019*a
	5%	1,097 ± 0,056*a	0,088 ± 0,032*b
	6%	1,164 ± 0,083*a	0,087 ± 0,021*b
18	1%	1,225 ± 0,076*b	0,094 ± 0,012*b
	2%	1,652 ± 0,052*c	0,113 ± 0,010*c
	3%	1,744 ± 0,087*d	0,106 ± 0,028*b
	4%	1,337 ± 0,053*b	0,082 ± 0,032*a
	5%	1,55 ± 0,029*c	0,136 ± 0,017*d
	6%	1,533 ± 0,091*c	0,125 ± 0,027*c

Tabel 7. Rata-rata pertumbuhan kalus (g) dengan medium glukosa ± SD (n=3)

Lama kultur (hari)	Konsentrasi glukosa	Berat basah (g) ± SD (n=3)	Berat kering (g) ± SD (n=3)
6	1%	0,997 ± 0,025*a	0,089 ± 0,007*a
	2%	0,997 ± 0,049*a	0,083 ± 0,036*a
	3%	1,119 ± 0,084*a	0,072 ± 0,028*a
	4%	1,037 ± 0,097*a	0,082 ± 0,034*a
	5%	1,018 ± 0,039*a	0,093 ± 0,008*a
	6%	0,988 ± 0,061*a	0,095 ± 0,042*a
12	1%	1,064 ± 0,034*a	0,093 ± 0,011*a
	2%	1,338 ± 0,056*b	0,083 ± 0,021*a
	3%	1,160 ± 0,087*a	0,073 ± 0,012*a

	4%	1,246 ± 0,093*b	0,088 ± 0,009*a
	5%	1,134 ± 0,041*a	0,097 ± 0,017*a
	6%	0,999 ± 0,067*a	0,099 ± 0,032*a
18	1%	1,455 ± 0,038*c	0,083 ± 0,009*a
	2%	1,354 ± 0,061*b	0,102 ± 0,041*b
	3%	1,414 ± 0,091*c	0,103 ± 0,056*b
	4%	1,475 ± 0,041*c	0,114 ± 0,011*b
	5%	1,156 ± 0,082*a	0,098 ± 0,017*a
	6%	1,305 ± 0,054*c	0,119 ± 0,054*b

Tabel 8. Kandungan betasianin (µg/g) dengan medium Sukrosa dan glukosa ± SD (n=3)

Lama kultur (hari)	Konsentrasi Sumber krbon	sukrosa ± SD (n=3)	glukosa ± SD (n=3)
6	1%	8,4 ± 0,022	8 ± 0,074
	2%	10,2 ± 0,041	26,4 ± 0,039
	3%	9,5 ± 0,081	9,1 ± 0,029
	4%	8,3 ± 0,099	9,1 ± 0,038
	5%	15,1 ± 0,032	9,7 ± 0,087
	6%	7,5 ± 0,068	5,7 ± 0,047
12	1%	21,3 ± 0,032	20,6 ± 0,076
	2%	41 ± 0,051	28,8 ± 0,029
	3%	18,4 ± 0,081	11,3 ± 0,086
	4%	28,6 ± 0,096	10,7 ± 0,097
	5%	32,8 ± 0,049	10,5 ± 0,056
	6%	16,7 ± 0,068	6,3 ± 0,087
18	1%	37,9 ± 0,031	40,3 ± 0,086
	2%	42,6 ± 0,069	32,1 ± 0,041
	3%	33,2 ± 0,094	40,8 ± 0,056
	4%	34,3 ± 0,042	33,2 ± 0,094
	5%	35,9 ± 0,089	21,2 ± 0,065
	6%	25 ± 0,057	8,7 ± 0,054

Tabel 9. Peningkatan berat basah (g) pada lama kultur 0 - 18 hari

Lama kultur (hari)	Konsentrasi sumber karbon (%)	sukrosa (g)	Glukosa (g)
0-6	1	0,005	0,005
	2	0,030	0,008
	3	0,005	0,081
	4	0,006	0,008
	5	0,012	0,009
	6	0,008	0,008
6-12	1	0,234	0,067
	2	0,320	0,341
	3	0,049	0,041
	4	0,081	0,209
	5	0,058	0,116
	6	0,167	0,011
12-18	1	0,008	0,391
	2	0,267	0,016
	3	0,751	0,254
	4	0,263	0,229
	5	0,453	0,022
	6	0,369	0,306

Tabel 10. Peningkatan kandungan betasianin (µg/g berat kering) pada lama kultur 6 - 18 hari

Lama kultur (hari)	Konsentrasi sumber karbon (%)	sukrosa (g)	Glukosa (g)
6-12	1	12,9	12,6
	2	30,8	2,4
	3	8,9	2,2
	4	20,3	1,6
	5	17,7	0,8
	6	9,2	0,8
12-18	1	16,6	19,7
	2	1,6	3,3
	3	24,8	29,5

	4	5,7	22,5
	5	3,1	10,7
	6	8,3	2,4
6-18	1	28,5	29,3
	2	32,4	5,7
	3	23,7	29,8
	4	26	24,1
	5	20,8	11,5
	6	17,5	2

Lampiran 5. Hasil Analisis Ragam (ANOVA) Pengaruh Sumber karbon (SB), Konsentrasi (K) dan Lama Kultur (LH) pada Berat basah, berat kering dan Kandungan Betasianin

Tabel 11. Uji analisis ragam antar subjek pada berat kalus basah (g)

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	5.071[a]	37	.137	2.197	.002
Intercept	76.044	1	76.044	1.219E3	.000
SB	.030	1	.030	.487	.487
K	.379	5	.076	1.216	.311
LH	1.490	2	.745	11.937	.000
SB * K	.284	5	.057	.911	.479
SB * LH	.103	2	.051	.823	.443
K * LH	.360	10	.036	.577	.828
SB * K * LH	.488	9	.054	.869	.556
Error	4.555	73	.062		
Total	169.904	111			
Corrected Total	9.626	110			

Tabel 12. Uji analisis ragam berdasarkan uji Games howell pada berat kalus basah (g) yang dipengaruhi oleh lama kultur (hari)

(I) Lama hari	(J) Lama hari	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95 Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
6 hari	12 hari	-.15529*	.043195	.002	-.25933	-.05124
	18 hari	-.42610*	.058880	.000	-.56941	-.28280
12 hari	6 hari	.15529*	.043195	.002	.05124	.25933

	18 hari	-.27081*	.068288	.001	-.43487	-.10676
18 hari	6 hari	.42610*	.058880	.000	.28280	.56941
	12 hari	.27081*	.068288	.001	.10676	.43487

Tabel 13. Uji analisis ragam antar subjek pada berat kalus kering (g)

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.694[a]	38	.018	1.743	.021
Intercept	54.538	1	54.538	5.208E3	.000
SB	.027	1	.027	2.596	.111
K	.107	5	.021	2.047	.082
LH	.106	2	.053	5.080	.009
SB * K	.015	5	.003	.291	.916
SB * LH	.007	2	.004	.340	.713
K * LH	.088	10	.009	.843	.589
SB * K * LH	.147	10	.015	1.403	.197
Error	.754	72	.010		
Total	120.626	111			
Corrected Total	1.448	110			

a. R Squared = ,479 (Adjusted R Squared = ,204)

Tabel 14. Uji analisis ragam berdasarkan uji Games howell pada berat kalus kering (g) yang dipengaruhi oleh lama kultur (hari)

Multiple Comparisons

Games-Howell

(I) Lama hari	(J) Lama hari	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95 Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
6 hari	12 hari	.0176	.02405	.744	-.0400	.0753

	18 hari	-.0978*	.02580	.001	-.1596	-.0360
12 hari	6 hari	-.0176	.02405	.744	-.0753	.0400
	18 hari	-.1154*	.02237	.000	-.1690	-.0619
18 hari	6 hari	.0978*	.02580	.001	.0360	.1596
	12 hari	.1154*	.02237	.000	.0619	.1690

*. The mean difference is significant at the ,05 level.

Tabel 15. Uji analisis ragam antar subjek pada kandungan betasianin (µg/g)

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	8.222[a]	38	.216	2.112	.003
Intercept	35.023	1	35.023	341.828	.000
SB	.278	1	.278	2.712	.104
K	1.569	5	.314	3.062	.015
LH	2.225	2	1.113	10.860	.000
SB * K	.260	5	.052	.507	.770
SB * LH	.679	2	.339	3.312	.042
K * LH	.491	10	.049	.480	.898
SB * K * LH	.341	10	.034	.333	.969
Error	7.377	72	.102		
Total	89.687	111			
Corrected Total	15.599	110			

a. R Squared = ,527 (Adjusted R Squared = ,277)

Tabel 16. Uji analisis ragam berdasarkan uji Games howell pada kandungan betasianin (mg/g) yang dipengaruhi oleh lama kultur (hari)

Games-Howell

(I) Lama hari	(J) Lama hari	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95 Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
6 hari	12 hari	-.2028*	.08069	.038	-.3963	-.0092
	18 hari	-.4958*	.06286	.000	-.6462	-.3453
12 hari	6 hari	.2028*	.08069	.038	.0092	.3963
	18 hari	-.2930*	.07782	.001	-.4799	-.1061
18 hari	6 hari	.4958*	.06286	.000	.3453	.6462
	12 hari	.2930*	.07782	.001	.1061	.4799

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = ,102.

*. The mean difference is significant at the ,05 level.

Tabel 17. Uji analisis ragam berdasarkan uji Games howell pada kandungan betasianin (µg/g) yang dipengaruhi oleh konsentrasi (sukrosa dan glukosa (1-6)

Multiple Comparisons

KB1

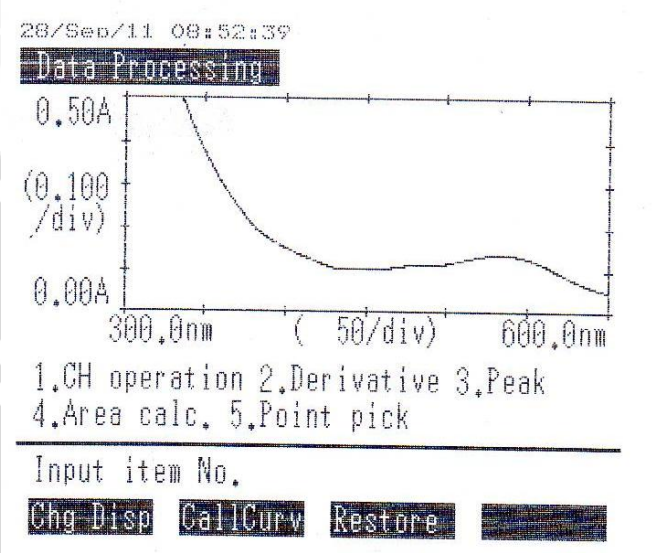
Games-Howell

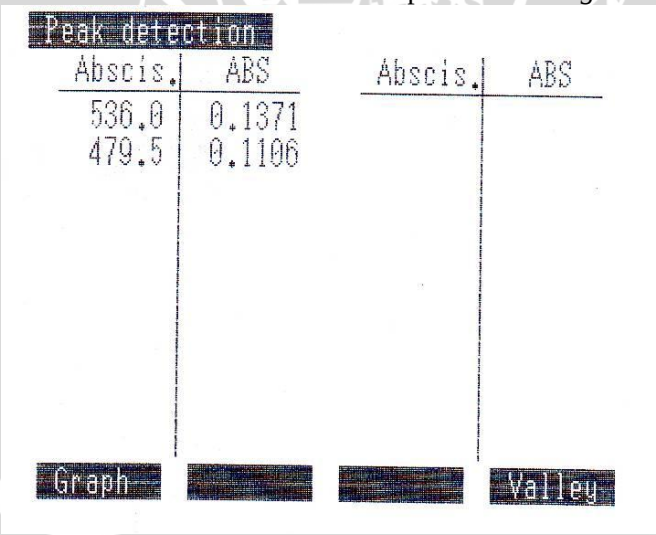
(I) Konsentrasi	(J) Konsentrasi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95 Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-.11806	.14122	.959	-.5444	.3082
	3	.03830	.13602	1.000	-.3726	.4492
	4	-.06260	.11944	.995	-.4275	.3023
	5	.05153	.13819	.999	-.3658	.4688

	6	.26501	.12285	.287	-.1088	.6389
2	1	.11806	.14122	.959	-.3082	.5444
	3	.15637	.13292	.845	-.2450	.5577
	4	.05546	.11589	.997	-.2980	.4089
	5	.16960	.13514	.807	-.2384	.5775
	6	.38307*	.11941	.034	.0202	.7459
3	1	-.03830	.13602	1.000	-.4492	.3726
	2	-.15637	.13292	.845	-.5577	.2450
	4	-.10090	.10949	.938	-.4338	.2320
	5	.01323	.12969	1.000	-.3782	.4047
	6	.22671	.11321	.363	-.1164	.5698
4	1	.06260	.11944	.995	-.3023	.4275
	2	-.05546	.11589	.997	-.4089	.2980
	3	.10090	.10949	.938	-.2320	.4338
	5	.11413	.11218	.908	-.2274	.4556
	6	.32761*	.09263	.014	.0479	.6073
5	1	-.05153	.13819	.999	-.4688	.3658
	2	-.16960	.13514	.807	-.5775	.2384
	3	-.01323	.12969	1.000	-.4047	.3782
	4	-.11413	.11218	.908	-.4556	.2274
	6	.21348	.11581	.454	-.1379	.5648
6	1	-.26501	.12285	.287	-.6389	.1088
	2	-.38307*	.11941	.034	-.7459	-.0202
	3	-.22671	.11321	.363	-.5698	.1164
	4	-.32761*	.09263	.014	-.6073	-.0479
	5	-.21348	.11581	.454	-.5648	.1379

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Lampiran 6. Hasil uji kualitatif sampel menggunakan Spektrofotometer UV-VIS



Gambar 14. Hasil uji kualitatif

Tabel 18. Hasil absorbansi maksimum sampel kalus *C. argentea*