



## **Respon Perlakuan Asam Jasmonat, Asam Salisilat dan Kitosan terhadap Produksi Metabolit Sekunder pada Kalus Padi Daun Berpigen**

*Response of Jasmonic Acid, Salicylic Acid, and Chitosan Treatment to Secondary Metabolite Production in Callus of Black Madras Rice*

Author(s): Rendryana Aulia Nur Khofifa<sup>(1)</sup>; Mohammad Ubaidillah<sup>(1)\*</sup>

<sup>(1)</sup> Universitas Jember

\*Corresponding author: [moh.ubaidillah.pasca@unej.ac.id](mailto:moh.ubaidillah.pasca@unej.ac.id)

*Submitted: 29 Jul 2023*

*Accepted: 19 Feb 2024*

*Published: 31 Mar 2024*

### **ABSTRAK**

Padi Black Madras (*Oryza sativa* L.) merupakan padi hias yang selain biasa digunakan sebagai ornamen, juga dapat digunakan sebagai sumber pharmaceutical yang bermanfaat bagi kesehatan manusia. Namun saat ini belum banyak diketahui potensialnya menjadi sumber pharmaceutical seperti metabolit sekunder. Metabolit sekunder yang dihasilkan oleh padi black madras ini dapat diambil melalui kultur jaringan dengan cara elisitasi. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui respon kalus padi dan produksi metabolit sekunder pada padi Black Madras terhadap pemberian asam jasmonat, asam salisilat, dan kitosan. Hasil penelitian ini menunjukkan pemberian elisitor memberikan respon pada kalus padi dan produksi metabolit sekunder padi black madras terhadap pemberian asam jasmonat, asam salisilat, dan kitosan. Varietas terbaik didapatkan pada varietas IR64 sebagai kontrol daripada Black madras dengan perlakuan dengan kandungan fenolik (0,1548 mg GAE/g) dan flavonoid (0,2830 mg QE/g) terbaik ada pada media dengan pemberian Asam Jasmonat 10ppm. Sedangkan pada antosianin dengan pemberian yang terbaik adalah Kitosan 50ppm (PC: 2,852 CV/g FW dan PP: 0,538 CV/ test tube). Varietas Black madras lebih cenderung dalam peningkatan biomassa dengan kandungan fenolik (0,1165 mg GAE/g) dan flavonoid (0,2107 mg QE/g) pada perlakuan kontrol meskipun dalam produksi antosianin cukup tinggi dengan Kitosan 50ppm (PC: 2,832 CV/g FW) dan Asam Salisilat 10ppm (PP: 0,440 CV/ test tube) lebih daripada perlakuan kontrol.

### **Kata Kunci:**

Elisitasi,  
Kultur Jaringan,  
Metabolit  
Sekunder  
Padi

### **Keywords:**

elicitation,  
tissue culture,  
rice,  
secondary  
metabolite

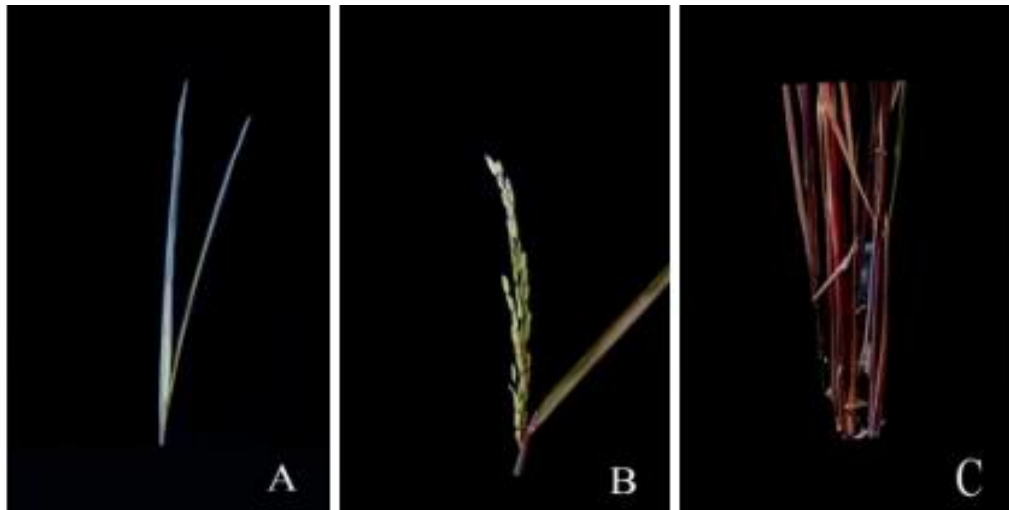
### **ABSTRACT**

*Black Madras Rice (Oryza sativa L.) is an ornamental rice, which apart from being used as an ornament, can also be used as a pharmaceutical source that is beneficial for human health. However, little is known about its potential as a source of pharmaceuticals such as secondary metabolites. The secondary metabolites produced by the black madras can be met through tissue culture by elicitation. This study was conducted to determine the response of the rice calli and the production of secondary metabolites of black madras rice to the supply of jasmonic acid, salicylic acid, and chitosan. The results of this study showed that elicitor addition gave a response to the rice calli and the production of secondary metabolites of black madras rice to the addition of jasmonate, salicylic acid, and chitosan. Compared to Black madras, IR64 was a better variety with the highest phenolic content (0,1548 mg GAE/g) and flavonoids (0,2830 mg QE/g) with the addition of 10 ppm jasmonate acid. Meanwhile, for the anthocyanins, the best dose is 50 ppm (PC: 2,852 CV/g FW and PP: 0,538 CV/test tube). The Black Madras variety is more likely to increase biomass which has phenolic (0.1165 mg GAE/g) and flavonoid (0.2107 mg QE/g) content in the control treatment even though the anthocyanin production is quite high with 50ppm Chitosan (PC: 2.832 CV /g FW) and 10ppm Salicylic Acid (PP: 0.440 CV/test tube) more than the control treatment.*

## PENDAHULUAN

Padi (*Oryza sativa* L.) merupakan tanaman pokok yang paling banyak dibudidayakan di Indonesia, dan Indonesia sendiri menjadi lima besar penyumbang produksi beras di dunia (Purwanti, 2022). Padi Black madras, padi berdaun ungu kehitaman jenis japonica, adalah padi asal korea yang juga banyak dibudidayakan di

Kalimantan (Puspito et al., 2022; Ubaidillah & Siswoyo, 2018) Padi tersebut tahan terhadap serangan blas dan tahan sedang terhadap salinitas serta kressek, meskipun demikian padi tersebut memiliki nilai produksi yang cukup rendah dan rentan biji hampa sehingga lebih sering menjadi padi ornamen (Jamilah et al., 2020; Ubaidillah & Siswoyo, 2018)



Gambar 1. Padi Black Madras (A) Daun, (B) Malai, (C) Batang, dari Yunita et al. (2022)  
Figure 1. Black Madras rice (A) Leaves, (B) Panicles, (C) Stems, from Yunita et al. (2022)

Padi black madras (Gambar 1) memiliki daun berpigmen ungu kehitaman karena memiliki kandungan antosianin tinggi pada daunnya dan memiliki kemampuan untuk menghambat mikroba (Jamilah et al., 2019; Yunita et al., 2022). Hal ini membuat padi black madras selain biasa digunakan sebagai ornamen, juga dapat digunakan sebagai sumber pharmaceutical yang bermanfaat bagi kesehatan manusia. Kebutuhan akan metabolit sekunder yang dihasilkan oleh padi black madras ini dapat diambil melalui kegiatan ekstraksi tanaman secara langsung (Sofy et al., 2021). Namun hal ini membutuhkan waktu, biaya dan tenaga lebih banyak karena jumlah yang didapat tidak sebanding. Kultur jaringan menjadi pilihan dalam memproduksi metabolit sekunder yang diinginkan karena ketika sel tanaman memperbanyak diri melalui

metode kultur jaringan, sifat genetik dan fisiologi dari tanaman pasti terikut dalam pembentukan (Habibah et al., 2021) Hal ini juga termasuk pada kultur benih padi, kalusnya akan mengikuti metabolisme tanaman secara umum yang mana dapat mengikuti metabolisme daun padi yang memiliki kandungan antosianin atau senyawa fenolik yang tinggi. Perbanyakan yang terjadi membuat kultur jaringan mampu memproduksi senyawa yang diinginkan dalam kondisi lebih terkontrol (Habibah et al., 2021)

Terlebih belakangan ini pemanfaatan metode kultur jaringan untuk mendapatkan senyawa metabolit yang diinginkan cukup banyak digunakan dengan diberi elisitor yang sesuai (El-Beltagi et al., 2022). Elisitasi atau pemberian elisitor merupakan tindakan yang menciptakan kondisi tidak nyaman

pada tanaman menggunakan media atau senyawa yang dapat membentuk metabolit sekunder sebagai media pertahanan (Fitria et al., 2018). Pemberian elisitor secara biotik seperti hormon dapat mengatur proses fisiologis di dalam kultur tanaman, di mana sinyal dari hormon sebagai elisitor ketika ditambahkan akan mengubah akumulasi metabolit sekunder melalui pengaturan ekspresi gen (Habibah et al., 2021).

Pemberian asam jasmonat pada kultur jaringan mampu meningkatkan banyak kandungan metabolit sekunder dan mengurangi stres dengan cara meningkatkan hormon endogen di dalamnya dan sistem antioksidan. (Nabi et al., 2021). Hal ini juga berlaku pada pemberian asam salisilat pada kultur jaringan juga mampu meningkatkan kandungan metabolit sekunder dan aktivitas antioksidan dari tanaman (Jirakiattikul et al., 2021). Pada kitosan sendiri juga terbukti meningkatkan metabolisme sekunder karena mampu meningkatkan respon pertahanan terhadap stres biotik dan abiotik yang mana membawa pada induksi enzim pertahanan tanaman, dan untuk sintesis metabolit sekunder. (Malerba & Cerana, 2016)

Penelitian lebih lanjut mengenai kultur kalus pada padi dengan daun berpigmen untuk produksi kandungan metabolit sekunder belum diketahui elisitor terbaiknya. Hal ini menjadi alasan dalam penelitian ini untuk perlunya mengetahui pengaruh pemberian elisitor dalam produksi metabolit sekunder kalus padi daun berpigmen.

## METODOLOGI

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Agrobioteknologi Prodi Agroteknologi Universitas Jember pada bulan Februari 2023 sampai Juni 2023 dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial. Faktor pertama berupa varietas padi yang terdiri atas padi

IR64 dan Black Madras dan faktor kedua berupa 4 jenis perlakuan elisitor berupa kontrol, 10 ppm hormon asam jasmonat, 50ppm hormon asam salisilat, dan 50ppm kitosan (Anusha et al., 2016; Eddijanto et al., 2022; El-Beltagi et al., 2022; Golkar et al., 2019). Biji padi yang telah dikupas dan disterilkan dikulturkan pada media dengan bahan 4 g/L N6 medium, 2 ppm 2,4-D, 30 g sukrosa, 2,878 g L-proline, 0,3 g Cassamino acid, 0,1 g Myoinositol, dan 4 g gelrite hingga berusia 8 minggu lalu dipindahkan pada media perlakuan elisitor untuk diamati morfologis tiap minggunya dan kemudian dilakukan penimbangan berat basah, berat kering, dan volume kalus. Setelah itu analisis produksi metabolit sekunder berupa kandungan fenolik, flavonoid dan antosianin.

### Analisis Kandungan Fenolik

Kandungan senyawa fenolik dari kalus menggunakan metode Hammerschmidt & Pratt (1978). Sebanyak 5 µl sampel dilarutkan dalam 45 µl methanol, 1 ml 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, dan 50 µl 50% Folin Ciocalteu. Hasil campuran divortex kemudian diinkubasi selama 30 menit. Nilai absorbansi diukur pada panjang gelombang 750 nm. Gallic acid digunakan sebagai standar. Satuan total fenol dalam mg gallic acid equivalent (GAE)/g sampel).

### Analisis Kandungan Flavonoid

Kandungan total flavonoid pada sampel menggunakan metode AlCl<sub>3</sub> yang dikemukakan oleh Lamaison & Carnet (1990) dengan beberapa modifikasi. 10 µl sampel dicampurkan ke dalam 40 µl methanol, 400 µl aquadest dan 30 µl 5% NaNO<sub>2</sub> setelah itu diinkubasikan selama 5 menit. Campuran tersebut kemudian ditambahkan 30 µl 10% AlCl<sub>3</sub> lalu diinkubasikan selama 6 menit. Tambahkan 200 µl 1 N NaOH dan 240 µl aquadest ke dalam larutan tersebut. Nilai absorbansi diukur pada panjang gelombang 415 nm. Quersetin digunakan sebagai standar

dengan satuan mg quercetin equivalent (QE)/g sampel.

#### Analisis Kandungan Antosianin

Kandungan antosianin dianalisis menggunakan metode yang dilakukan oleh Ram et al. (2013) di mana kalus diambil dan dihomogenkan dengan MeOH-HCl (methanol dan 1% HCl, v/v) dengan volume ekuivalen 20% dengan berat kalus segar. Larutan disentrifugasi pada 12.000 x g selama 10 menit. Optical Density (OD) yang digunakan untuk mengukur absorbansi tiap sampel menggunakan kuvet dengan lebar 1 cm dan panjang gelombang UV-Vis 525nm. Total antosianin sendiri dilihat berdasarkan indeks nilai pigmen (*Color Value Index*)

yang mana digunakan untuk menghitung kandungan dan produksi pigmen.

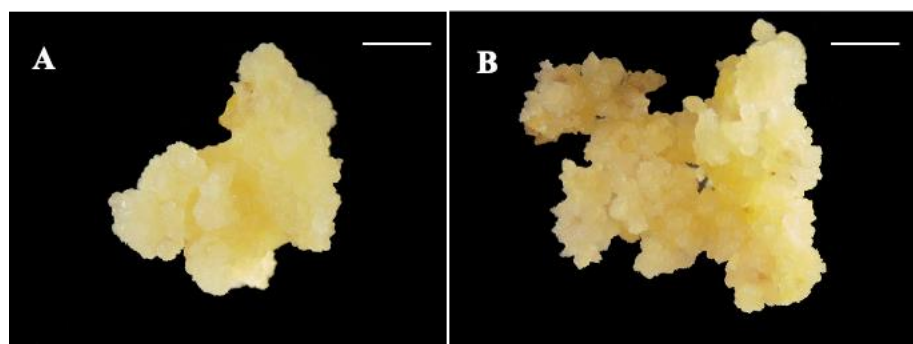
$Pigment\ content = 0,1 \times OD_{525} \times dilution\ factor.$

$Pigment\ production = Pigment\ content \times berat\ rata-rata\ kalus\ segar.$

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Morfologi Kalus

Morfologi kalus yang dihasilkan dari varietas Black madras dan IR64 memiliki kalus yang mirip dengan ciri-ciri berwarna putih kekuningan, remah, nodular, dan terlihat licin. Namun kalus yang dihasilkan varietas black madras lebih terlihat kuning, dan lebih bulat daripada varietas IR64 (Gambar 2).



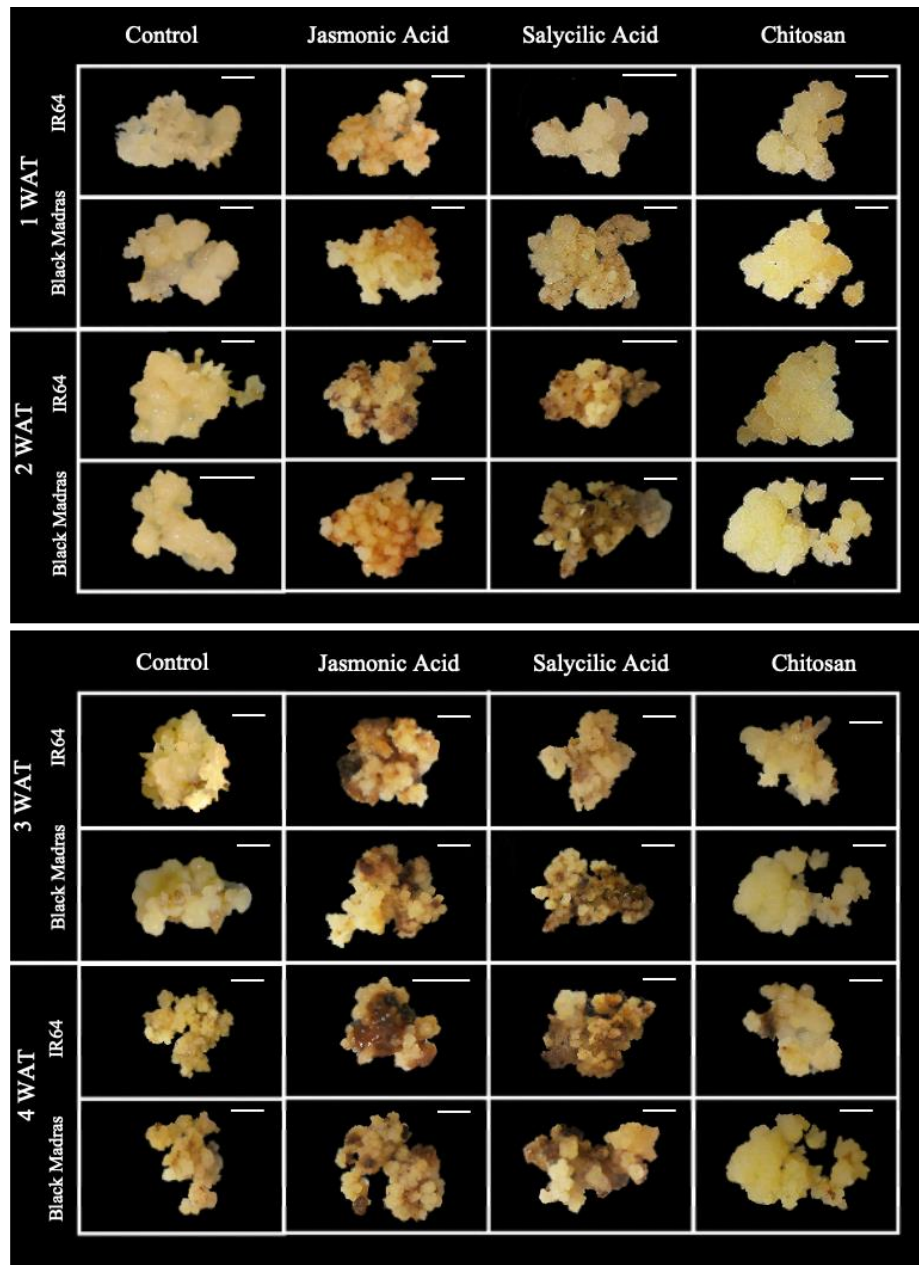
Gambar 2. Morfologi kalus varietas tanaman padi (A) Black madras (BM), (B) IR64, sebelum dipindahkan pada media perlakuan. (scale bars = 1 mm)

Figure 2. Morphology of callus of rice plant varieties (A) Black Madras (BM), (B) IR64, before being transferred to the treatment medium. (scale bars = 1 mm)

Pada padi, kalus berusia 15-27 hari telah memasuki *stationary phase*, yang mana pertumbuhan melambat dan tidak ada perbedaan massa (Meesook et al., 2020). Hal ini menjadikan kalus berusia 8 minggu kemudian disubkulturkan ke media perlakuan akan menghasilkan morfologis yang berbeda setiap perlakuan dan varietasnya. Kalus menurut Downey et al. (2019) terbagi menjadi beberapa klasifikasi seperti (1) “yellow/green” callus, kalus berstruktur nodular berwarna kuning kehijauan dan agak lunak (K1), (2) “compact white” callus berkarakteristik halus, permukaan putih (K2), (3) “friable

callus”, dengan permukaan lembut, terlihat berair, serta potensi embiogenik yang rendah, dan (4) “browning” callus (K4). Berdasarkan hal ini kalus yang dihasilkan oleh varietas black madras dan IR64 termasuk pada kategori 3.

Setelah kalus cukup dewasa yakni telah berusia 8 minggu sejak induksi kalus pertama kali, kalus kemudian dipindahkan pada media perlakuan yang diamati perubahan morfologis tiap minggunya sampai berusia 4 minggu dengan subkultur di media perlakuan setiap dua minggu (Gambar 3).



Gambar 3. Morfologi kalus representatif dengan perlakuan pada media dan varietas IR64 dan Black Madras (BM) setelah 1, 2, 3 dan 4 minggu pada media perlakuan Asam Jasmonat, Asam Salisilat, dan Kitosan (*scale bars = 1 mm*) (MSP= Minggu Setelah Perlakuan)

Figure 3. Representative callus morphology with treatment on media and IR64 and Black Madras (BM) after 1, 2, 3, and 4 weeks on media treated with Jasmonic Acid, Salicylic Acid, and Chitosan (*scale bars = 1 mm*) (MSP= Week After Treatment)

Pada minggu pertama dan kedua setelah dipindahkan pada media perlakuan, kalus yang dari sebelumnya berwarna putih kekuningan telah mengalami perubahan warna signifikan, bahkan dari minggu pertama ke minggu kedua sudah terlihat

dengan jelas. Berdasarkan gambar kalus 2 dengan media perlakuan Asam Jasmonat membuat perubahan warna dengan penggelapan yang dimulai dari satu bagian kemudian merata dan terlihat penyusutan yang signifikan pada minggu kedua. Hal



ini juga berlaku pada hasil dari perlakuan lainnya. Namun, hal ini tidak berlaku pada perlakuan Kitosan. Pada gambar perlakuan kitosan baik varietas IR64 maupun Black madras tidak mengalami penyusutan melainkan terlihat penambahan massa dan perubahan warna menjadi kekuningan yang tidak terlalu kentara. Sedangkan pada perlakuan kontrol terjadi sedikit kemunculan pigmen.

Minggu ketiga dan keempat setelah dilakukan pengamatan dengan mengambil dari data yang representatif, diketahui bahwa terjadi perubahan yang signifikan pada sampel terhadap tekstur dan warna. Seperti pada Gambar 2 pada perlakuan Asam Jasmonat pada minggu ketika yang berubah pada minggu keempat terlihat perubahan tekstur yang sedikit remah menjadi kompak, basah, dan menyusut dengan jumlah signifikan. Hal ini juga berlaku pada semua perlakuan lainnya. Meski pada perlakuan kitosan penyusutan

dan perubahan warna yang terjadi tidak terlalu terlihat.

Kalus setelah dipindahkan pada media perlakuan yang mengandung elisitor terjadi perubahan morfologis secara signifikan baik pada minggu pertama ke kedua, minggu kedua ke ketiga, dan minggu ketiga ke ke empat. Masing-masing kalus yang diambil merupakan kalus yang representatif dari keseluruhan kalus. Berdasarkan pigmen yang dihasilkan, perubahan pigmen yang terjadi pada kalus menunjukkan fase dari kalus. Kalus putih merupakan kalus muda yang sulit beradaptasi dan sangat mudah membelah, pada kalus kekuningan merupakan fase akhir dari kalus embrionik yang siap membelah dan memiliki adaptasi yang tinggi, sedangkan pada kalus berpigmen kecokelatan merupakan kalus yang telah masuk pada fase penuaan dan juga terjadi karena senyawa fenolik yang terakumulasi. (Ariati et al., 2012; Yelnitis, 2012)

### Berat Basah, Berat Kering, dan Volume Kalus

Tabel 1. Berat Basah, Berat Kering, dan Volume Kalus

Table 1. Fresh Weight, Dry Weight, and Callus Volume

Varietas	Perlakuan	Berat Basah (g)	Berat Kering (g)	Volume Kalus (ml)
IR64	Kontrol	0,1839±0,013	0,0313±0,007	0,96±0,055
	Asam Jasmonat (10ppm)	0,1337±0,015	0,0243±0,003	0,81±0,134
	Asam Salisilat (50ppm)	0,1378±0,024	0,0206±0,004	0,84±0,089
	Kitosan (50ppm)	0,1885±0,042	0,0271±0,005	0,98±0,055
Black Madras	Kontrol	0,15328±0,01	0,0271±0,006	0,98±0,045
	Asam Jasmonat (10ppm)	0,1542 ±0,042	0,0258±0,007	0,92±0,084
	Asam Salisilat (50ppm)	0,1615±0,014	0,0198±0,005	0,96±0,055
	Kitosan (50ppm)	0,1233±0,019	0,0187±0,001	0,98±0,055

Tidak ada perbedaan nyata pada berat basah, berat kering, dan volume kalus setelah perlakuan pemberian elisitor. Namun dalam pengkarakteristikannya diketahui bahwa persentase reduksi berat basah ke kering, menunjukkan bahwa reduksi paling rendah berasal dari perlakuan Asam jasmonat dengan varietas IR64 sebanyak 81,83% dan paling tinggi adalah dari pemberian Asam salisilat varietas Black Madras dengan persentase reduksi sebesar 87,74%.

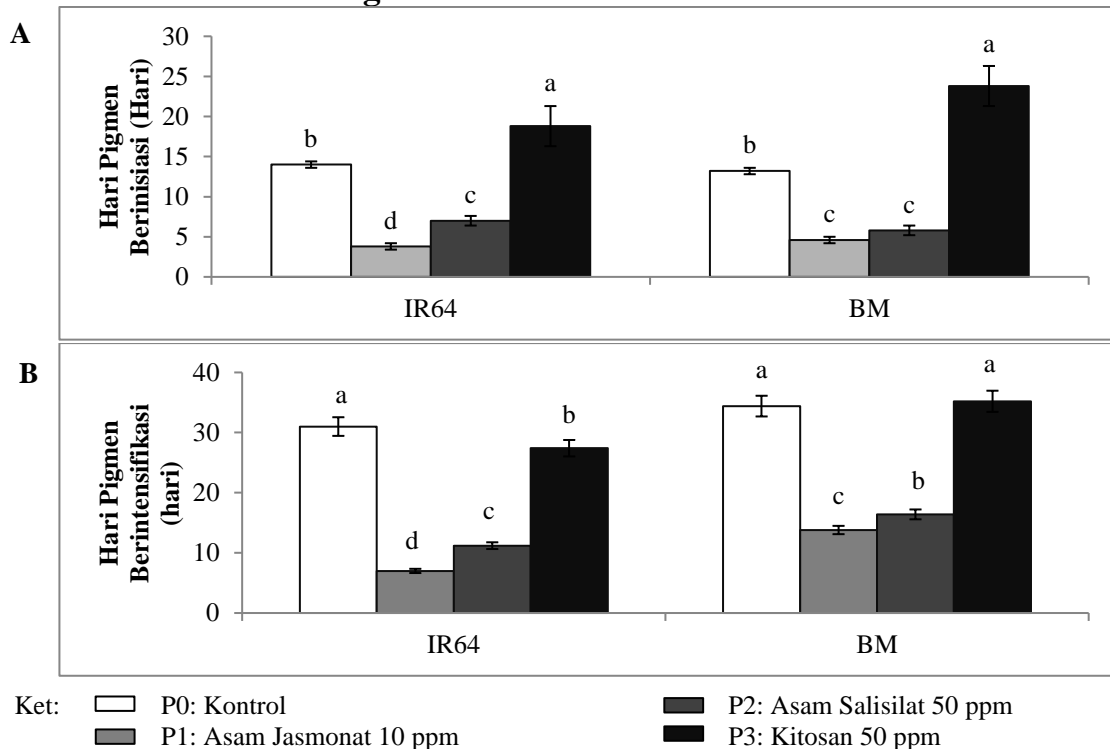
Pada varietas dan perlakuan yang memiliki persentase reduksi berat basah dan kering dari yang paling rendah menjadi paling tinggi adalah IR64\_Asam Jasmonat (81,83%), Black Madras\_Kontrol (82,32%), IR64\_Kontrol (82,98%), Black Madras\_Asam Jasmonat (83,27%), Black Madras\_Kitosan (84,83%), IR64\_Asam Salisilat (85,05%), IR64\_Kitosan (85,62%), Black Madras\_Asam Salisilat (87,74%). Berdasarkan hal ini, yang menunjukkan bahwa varietas yang

mengalami reduksi paling sedikit adalah IR64 dan paling tinggi adalah Black madras.

Berat basah dan berat kering yang dihasilkan pada tabel 1 mempengaruhi viabilitas dari sel kalus tersebut, di mana pemberian elisitor tertentu akan menurunkan viabilitas sel karena kegagalan regenerasi yang diduga dapat ditandai dengan rendahnya persentase reduksi berat (Silja et al., 2014). Hal ini karena sel yang viabilitasnya rendah tidak akan mampu regenerasi dan akan cepat memasuki fase stationary (stagnan) yakni fase sebelum fase kematian di mana di fase ini merupakan fase sekitar pembentukan dari metabolit sekunder (Abdel-Aziz et al., 2017). Sebuah varietas dengan perlakuan yang telah diberikan akan cepat memasuki fase stationary tentunya diduga akan menghasilkan metabolit sekunder lebih banyak sebagai respon stres. Namun berdasarkan penelitian yang dilakukan

oleh Mariamah et al. (2017). Pemberian perlakuan elisitor dan jenis varietas beberapa diantaranya diduga dapat lebih memilih pertumbuhan kalus dibandingkan memproduksi metabolit sekunder berdasarkan karakteristiknya. Hal ini sejalan dengan pemberian elisitor Asam salisilat dan kitosan pada kultur *Fagonia indica* dan juga pada *Gentiana dinarica* yang mengalami penambahan biomassa (Khan et al., 2019; Krstić-Milošević et al., 2017) Persentase reduksi pada perlakuan asam salisilat dan kitosan terlepas dari varietasnya berdasarkan tabel 1 sangat tinggi, menunjukkan kemungkinan bahwa perlakuan lebih memilih pertumbuhan kalus sehingga berat kering yang dihasilkan lebih sedikit daripada perlakuan asam jasmonat dan kontrol. Pada varietas sendiri, IR64 memiliki kecenderungan untuk lebih menghasilkan produk metabolit sekunder daripada pembentukan kalus seperti Black Madras.

### Lama Waktu Keluar Pigmen



Gambar 4. Lama waktu keluar warna pada tahap inisiasi (A) dan pada tahap intensifikasi warna (B).

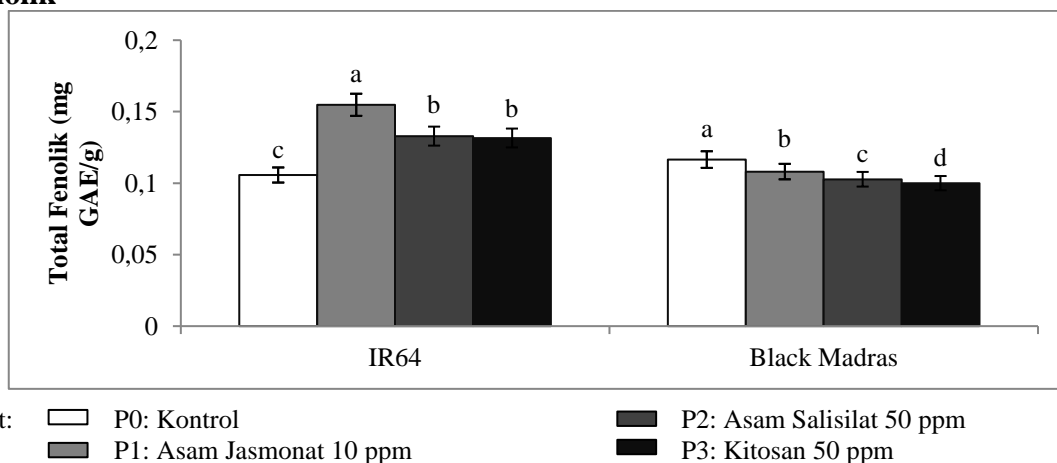
Figure 4. Length of time for color to appear at the initiation stage (A) and the color intensification stage (B).

Lama waktu munculnya warna hingga terintensifikasi pada kalus terdiri dari berbagai macam (Gambar 4). Tipe warnanya berupa kekuningan coklat (inisiasi) yang kemudian merujuk pada warna coklat (intensifikasi) dan hitam, menunjukkan bahwa pada fase inisiasi warna varietas yang paling cepat untuk menghasilkan perubahan warna dan intensifikasinya adalah dari perlakuan Asam Jasmonat dilanjutkan Asam Salisilat, Kontrol dan Kitosan. Sedangkan varietas dan perlakuan pada fase inisiasi maupun intensifikasi warna rata-rata yang paling cepat adalah IR64\_Asam jasmonat (3,8 hari; 7 hari) dan yang paling lambat adalah Black Madras\_Kitosan (23,8 hari; 35,2 hari). Pada fase inisiasi setelah IR 64\_Asam Jasmonat (3,8 hari) dilanjutkan dengan Black Madras\_Asam Jasmonat (4,6 hari), Black Madras\_Asam Salisilat (5,8 hari), IR 64\_Asam salisilat (7 hari), Black Madras\_Kontrol (13,2 hari), IR 64\_kontrol (14 hari), IR64\_kitosan (18,8 hari) dan Black Madras\_kitosan (23,8 hari). Pada fase intensifikasi setelah IR 64\_Asam jasmonat (7 hari) dilanjutkan dengan Black Madras\_Asam jasmonat (11,2 hari), Black Madras\_Asam salisilat (13,8 hari), IR64\_Asam salisilat (16,4 hari), Black Madras\_kontrol (27,4 hari), IR64\_kontrol

(31 hari), IR64\_kitosan (34,4 hari) dan Black Madras\_kitosan (35,2 hari).

Lama waktu inisiasi pigmen berupa kecokelatan yang terjadi pada tiap varietas dan perlakuan memiliki perbedaan yang mencolok di mana yang paling cepat untuk menimbulkan pigmen coklat kemerahan adalah perlakuan dengan Asam Jasmonat sebanyak 10 ppm. Hal ini didukung dengan gambar 2 di mana dengan perlakuan asam jasmonat sejak minggu pertama sudah menunjukkan inisiasi warna berupa warna kuning dan pada minggu kedua sudah mulai berubah menjadi coklat. Kecepatan dari masing-masing elisitor untuk membuat kalus mengalami inisiasi warna ataupun intensifikasi warna tergantung pada konsentrasi yang diberikan dan jenis elisitor yang diberikan, seperti apabila terlalu rendah tidak akan memberikan waktu inisiasi ataupun intensifikasi pigmen yang lebih cepat (Lakhota et al., 2014). Hal ini sejalan dengan pemberian asam jasmonat pada *Rhodiola imbricata* yang mengalami peningkatan kadar fenolik yang berkaitan erat dengan munculnya pigmen, di mana memiliki pengaruh sangat nyata terhadap konsentrasi dan waktu perlakuan (Duwi Fanata et al., 2022; Kapoor et al., 2019).

## Fenolik



Gambar 5. Pengaruh perlakuan pada kandungan total fenolik (TP) di padi varietas IR64 dan Black Madras

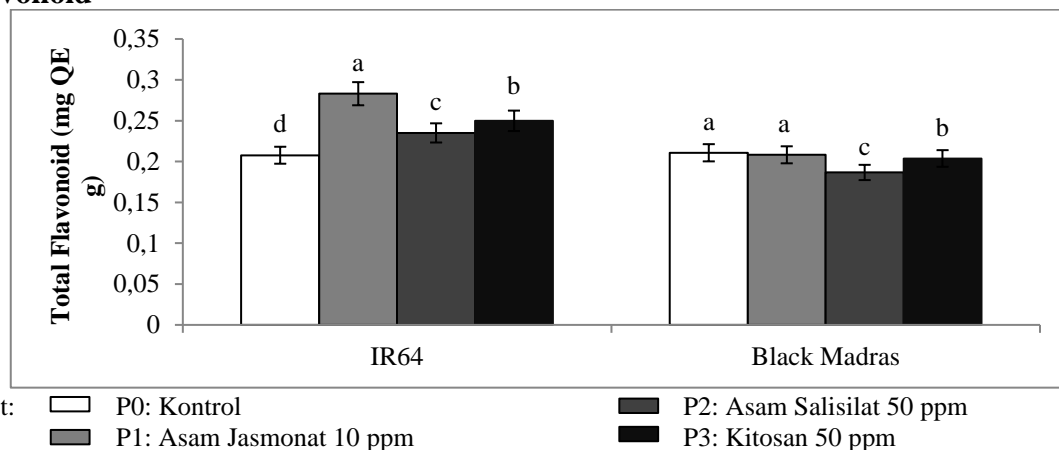
Figure 5. Effect of treatment on total phenolic (TP) content in rice varieties IR64 and Black Madras



Kandungan fenolik pada kultur (Gambar 5) mengalami kenaikan signifikan pada semua perlakuan elisitor varietas IR64 tetapi tidak pada varietas black madras yang mengalami penurunan pada semua perlakuan dan menunjukkan penurunan yang paling rendah pada perlakuan kitosan 50 ppm. Pada varietas IR64 Kandungan fenolik yang diberikan 10 ppm Asam jasmonat, 50 ppm Asam

salisilat dan 50 ppm kitosan yang diberikan pada varietas IR64 lebih tinggi daripada perlakuan kontrol dengan perlakuan yang menghasilkan kandungan fenolik paling rendah adalah kontrol. Pemberian kitosan sebanyak 50ppm pada varietas black madras menginduksi akumulasi terendah pada TP sebanyak 0,1 mg GAE/g dan tertinggi pada asam jasmonat 10 ppm pada varietas IR64 sebanyak 0,1548 mg GAE/g.

## Flavonoid



Gambar 6. Pengaruh perlakuan pada kandungan total flavonoid (TF) di padi varietas IR64 dan Black Madras

Figure 6. Effect of treatment on total flavonoid (TF) content in IR64 and Black Madras rice varieties

Kandungan flavonoid pada kultur (Gambar 6) mengalami kenaikan signifikan pada semua perlakuan elisitor varietas IR64 daripada perlakuan kontrol tetapi tidak pada varietas black madras yang mengalami penurunan pada semua perlakuan dan menunjukkan penurunan yang paling rendah pada perlakuan asam salisilat 50ppm. Kandungan flavonoid yang diberikan dengan 10 ppm Asam jasmonat, 50 ppm Asam salisilat atau pun 50 ppm kitosan yang diberikan pada varietas IR64 lebih tinggi daripada perlakuan kontrol. Pemberian asam salisilat sebanyak 50ppm pada varietas black madras menginduksi akumulasi terendah pada TF sebanyak 0,1866 mg QE/g dan tertinggi pada asam jasmonat 10

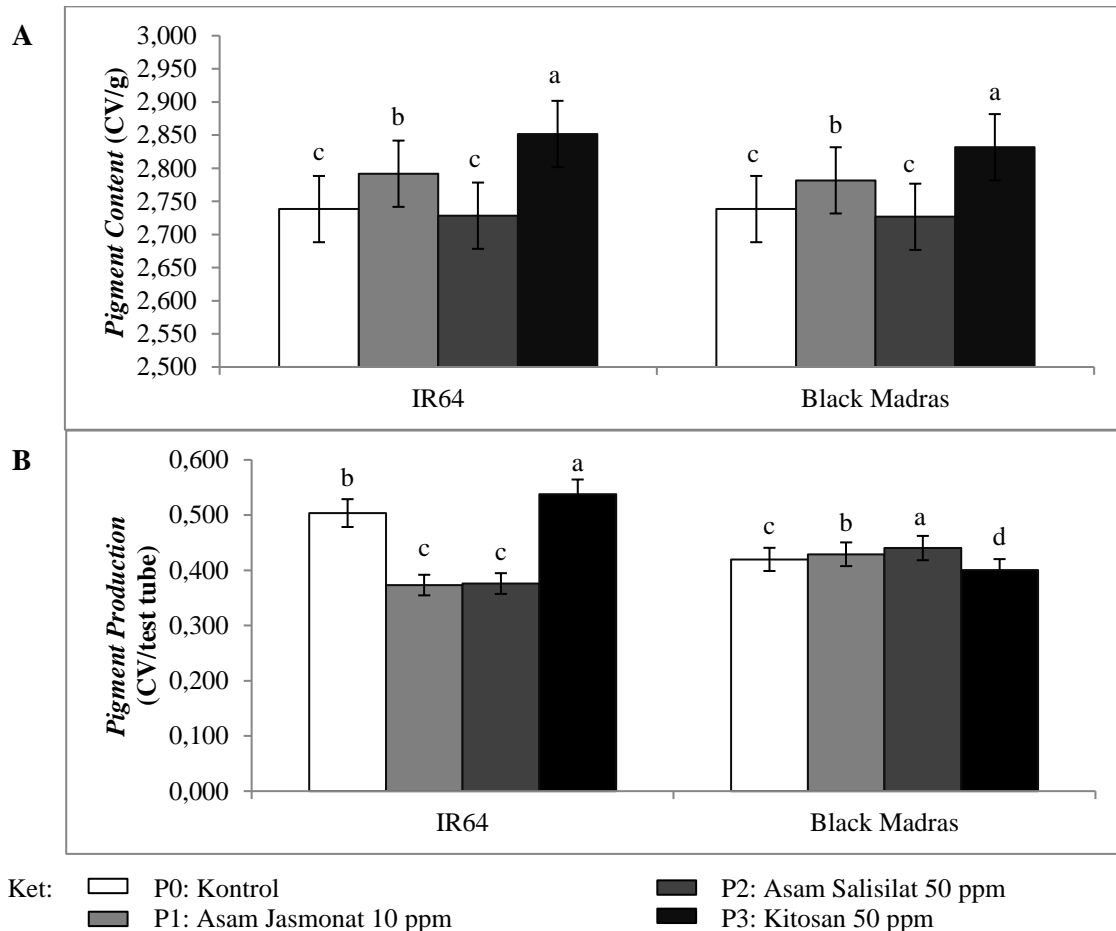
ppm pada varietas IR64 sebanyak 0,2830 mg QE/g.

Hasil kandungan fenolik dan flavonoid pada minggu keempat setelah perlakuan menunjukkan bahwa varietas IR64 dengan pemberian elisitor berupa asam Jasmonat menunjukkan hasil yang terbaiknya. Berbanding terbalik dengan varietas Black Madras yang memiliki nilai lebih rendah daripada kontrol yang diberikan. Hal ini menandakan bahwa varietas juga berpengaruh pada produksi metabolit sekunder. Terlebih kalus pada perlakuan kontrol yang digunakan yang sudah cukup sering terpapar subkultur untuk pembaharuan nutrisi memungkinkan untuk terjadi peningkatan kadar fenolik, dan flavonoidnya. Mengesampingkan nilai yang dimiliki oleh perlakuan kontrol,

perlakuan asam jasmonat memberikan perlakuan terbaik daripada perlakuan lainnya. Hal ini dikarenakan asam jasmonat memberikan efek pada *phenylpropanoid pathway* yang

### Antosianin

merupakan bagian dari flavonoid dan juga mampu meningkatkan kandungan fenoliknya seperti pada *Fagopyrum esculentum* Moench (Park et al., 2019).



Gambar 7. Pengaruh perlakuan pada kandungan antosianin (A) pigment content (PC), (B) Pigment production (PP) di padi varietas IR64 dan Black Madras

Figure 7. Effect of treatment on anthocyanin content (A) pigment content (PC), (B) Pigment production (PP) in rice varieties IR64 and Black Madras

Pengaplikasian elisitor pada kalus terhadap kandungan antocyanin di mana berdasarkan *pigment content* (PC) atau pun *pigment production* (PP) nilai pigmen (CV) yang didapat tertinggi berasal dari perlakuan Kitosan dengan varietas yang paling baik adalah IR64. Namun, hal ini sedikit berbeda dengan PP pada varietas Black Madras yang mana perlakuan terbaik didapat dari perlakuan asam salisilat. Sedangkan yang paling rendah pada kandungan PC adalah dari perlakuan asam

salisilat terhadap semua varietas. Pada varietas IR64 yang palingrendah pada PP adalah perlakuan Asam Jasmonat, dan pada varietas Black madras yang paling rendah kandungan PPnya adalah Kitosan. Pemberian asam salisilat sebanyak 50ppm pada varietas black madras menginduksi akumulasi terendah pada PC sebanyak 2,727 CV/g FW dan tertinggi pada kitosan pada varietas IR64 sebanyak 2,852 CV/g FW. Pada akumulasi terendah PP dengan pemberian elisitor Asam Jasmonat pada

varietas IR64 didapatkan sebanyak 0,373 CV/test tube dengan akumulasi tertinggi didapatkan dari perlakuan kitosan pada varietas IR64 sebanyak 0,538 CV/ test tube.

Antosianin yang terdeteksi pada kalus dengan berbagai perlakuan elisitor menunjukkan pada perlakuan Kitosan kebanyakan menjadi perlakuan terbaik, baik pada pigment content maupun pigment production. Hal ini sejalan dengan penelitian sebelumnya yakni kitosan, pektin, dan alginat dapat meningkatkan produksi antosianin dalam waktu 13 hari kultur kalus *Vitis vinifera* (Cai et al., 2012). Sesuai apa yang ada pada gambar 2 terlihat bahwa pada minggu kedua setelah perlakuan terdapat perubahan warna menjadi lebih kekuningan, dan pada minggu terakhir pengamatan warna dari kalus yang mendapatkan perlakuan kitosan berwarna sedikit kecokelatan merah yang tidak merata. Berbeda dengan perlakuan lain yang kebanyakan sudah menjadi berwarna coklat gelap akibat fenolik yang tinggi.














## KESIMPULAN

Pemberian perlakuan Asam Jasmonat, Asam Salisilat, dan Kitosan memberikan pengaruh tidak nyata pada berat basah, berat kering, dan volume kalus pada semua varietas. Namun memberikan pengaruh signifikan dan terbaik dalam produksi metabolit sekunder pada varietas IR64 dengan perlakuan berupa Asam Jamonat (10ppm) untuk Fenolik dan Flavonoid serta Antosianin pada Kitosan (50ppm). Pada varietas Black Madras cenderung pada pertambahan biomassa dan Antosianin dengan *Pigment Content* (PC) berupa Kitosan (50ppm) dan *Pigment Production* (PP) (10ppm). Sedangkan pada variabel lama waktu munculnya pigmen, baik pada varietas IR64 maupun varietas Black Madras sama-sama menunjukkan hasil terbaik dengan tercepat pada perlakuan Asam Jasmonat (10ppm).

## DAFTAR PUSTAKA

- Abdel-Aziz, S. M., Abo Elsoud, M. M., & Anise, A. A. H. (2017). Microbial Biosynthesis: A Repertory of Vital Natural Products. In *Handbook of Food Bioengineering* (pp. 25–54). Elsevier Inc.
- Anusha, T. S., Joseph, M. V., & Elyas, K. K. (2016). Callus induction and elicitation of total phenolics in callus cell suspension culture of celastrus paniculatus - Willd, an endangered medicinal plant in India. *Pharmacognosy Journal*, 8(5), 471–475.
- Ariati, S. N., Waeniati, Muslimin, & Suwastika., I. . (2012). Induksi Kalus Tanaman Kakao (*Theobroma cacao* L.) Pada Media MS Dengan Penambahan 2,4-D, BAP Dan Air Kelapa. *Jurnal Natural Science*, 1(1), 74–84.
- Cai, Z., Kastell, A., Mewis, I., Knorr, D., & Smetanska, I. (2012). Polysaccharide elicitors enhance anthocyanin and phenolic acid accumulation in cell suspension cultures of *Vitis vinifera*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 108(3), 401–409.
- Downey, C. D., Zoń, J., & Jones, A. M. P. (2019). Improving callus regeneration of *Miscanthus × giganteus* J.M.Greef, Deuter ex Hodk., Renvoize ‘M161’ callus by inhibition of the phenylpropanoid biosynthetic pathway. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 55(1), 109–120.
- Duwi Fanata, W., Edo Setiawan, D., Mar, I., & Sholikhah, A. (2022). Pengaruh Penambahan Inhibitor Etilen dan Senyawa Antioksidan terhadap Regenerasi Kalus Padi Mentik Wangi Susu The Effect of Additional

- Inhibitor Ethylene and Antioxidant Compounds on Regeneration of Mentik Wangi Susu Rice Callus. *Jurnal Agrikultura*, 2022(2), 236–246.
- Eddijanto, I., Restiani, R., & Aditiyarini, D. (2022). Elisitasi Flavonoid menggunakan Kitosan pada Kultur Kalus Ginseng Jawa (*Talinum paniculatum* Gaertn.). *Sciscitatio*, 3(2), 90–99.
- El-Beltagi, H. S., Mohamed, H. I., Aldaej, M. I., Al-Khayri, J. M., Rezk, A. A., Al-Mssallem, M. Q., Sattar, M. N., & Ramadan, K. M. A. (2022). Production and antioxidant activity of secondary metabolites in Hassawi rice (*Oryza sativa* L.) cell suspension under salicylic acid, yeast extract, and pectin elicitation. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 58, 615–629.
- Fitria, M. W., Putri, W. D. R., & Maligan, J. M. (2018). Peran Kejut Listrik Dan Temperatur Sebagai Elisitor Dalam Meningkatkan Kandungan Senyawa Bioaktif Dan Aktivitas Antioksidan Pada Kedelai (*Glycine Max*): Kajian Pustaka. *Jurnal Pangan Dan Agroindustri*, 6(4), 18–25.
- Golkar, P., Taghizadeh, M., & Yousefian, Z. (2019). The effects of chitosan and salicylic acid on elicitation of secondary metabolites and antioxidant activity of safflower under in vitro salinity stress. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 137(3), 575–585.
- Habibah, N. A., Rahayu, E. S., & Anggraito, Y. U. (2021). *Buku Ajar Kultur Jaringan Tumbuhan*. Deepublish.
- Hammerschmidt, P. A., & Pratt, D. E. (1978). Phenolic Antioxidants Of Dried Soybeans. *Journal of Food Science*, 43(2), 556–559.
- Jamilah, Ahmad, R., & Ernita, M. (2020). Application of Chromolaena odorata Liquid Fertilizer and Potassium in Reducing Grain Voidness and Improving Yield of Black Madras Purple Rice. *Agronida*, 6(1), 55–63.
- Jamilah, Haryoko, W., & Akriweldi, W. (2019). Response of Black Madras Purple Rice to Pruning and Application of Unitas Super Liquid Organic Fertilizer. *Planta Tropika*, 7(1), 26–32.
- Jirakiattikul, Y., Rithichai, P., Songsoem, K., & Itharat, A. (2021). Elicitation of salicylic acid on secondary metabolite production and antioxidant activity of in vitro *musa acuminata* l. Cv. ‘gros michel’ shoots. *Current Applied Science and Technology*, 21(3), 569–578.
- Kapoor, S., Sharma, A., Bhardwaj, P., Sood, H., Saxena, S., & Chaurasia, O. P. (2019). Enhanced Production of Phenolic Compounds in Compact Callus Aggregate Suspension Cultures of *Rhodiola imbricata* Edgew. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 187(3), 817–837.
- Khan, T., Khan, T., Hano, C., & Abbasi, B. H. (2019). Effects of chitosan and salicylic acid on the production of pharmacologically attractive secondary metabolites in callus cultures of *Fagonia indica*. *Industrial Crops and Products*, 129(December 2018), 525–535.
- Krstić-Milošević, D., Janković, T., Uzelac, B., Vinterhalter, D., & Vinterhalter, B. (2017). Effect of elicitors on xanthone accumulation and biomass

- production in hairy root cultures of *Gentiana dinarica*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 130(3), 631–640.
-  Lakhotia, P., Singh, K. P., Singh, S. K., Singh, M. C., Prasad, K. V., & Swaroop, K. (2014). Influence of biotic and abiotic elicitors on production of betalain pigments in *bougainvillea* callus cultures. *Indian Journal of Horticulture*, 71(3), 373–378.
-  Lamaison, J. L. C., & Carnet, A. (1990). Teneurs en principaux flavonoïdes des fleurs de *Crataegus monogyna* Jacq. et de *Crataegus laevigata* Poir. D.C. en fonction de la végétation. *Pharmaceutica Acta Helveticae*, 65, 315–320.
-  Malerba, M., & Cerana, R. (2016). Chitosan Effects on Plant Systems. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(996), 1–15.
-  Mariamah, Mukarlina, & Linda, R. (2017). Pertumbuhan Kalus Tanaman Markisa (*Passiflora* sp.) dengan Penambahan Naphtalene Acetic Acid (NAA) dan 6-Benzyl Amino Purine (BAP). *Protobiant*, 6(3), 37–41.
-  Meesook, K., Pongtongkam, P., Pongjaroenkit, S., & Poeaim, A. (2020). Duration for callus propagation of indica rice (*Oryza sativa* L.) cultivar Sangyod in suspension culture. *International Journal of Agricultural Technology*, 16(1), 77–86.
-  Nabi, N., Singh, S., & Saffeullah, P. (2021). Responses of in vitro cell cultures to elicitation : regulatory role of jasmonic acid and methyl jasmonate : a review. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 57(2021), 341–355.
-  Park, C. H., Yeo, H. J., E., P. Y., Chun, S. W., Chung, Y. S., Lee, S. Y., & Park, S. U. (2019). Influence of Chitosan, Salicylic Acid and Jasmonic Acid on Phenylpropanoid Accumulation in Germinated Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Foods*, 8(153), 1–10.
-  Purwanti, T. (2022). 5 Negara Penghasil Beras Terbesar Dunia, RI ke Berapa? CNBC Indonesia.
-  Puspito, A. N., Nabilah, S., Buqori, D. M. A. I., Hartatik, S., Kim, K.-M., & Ubaidillah, M. (2022). Genetic Diversity Analysis of Indonesian Rice Germplasm (*Oryza sativa* L.) with Simple Sequence Repeat Markers. *Agronomy Research*, 20(X), 1–13.
-  Ram, M., Prasad, K. V., Singh, S. K., Hada, B. S., & Kumar, S. (2013). Influence of salicylic acid and methyl jasmonate elicitation on anthocyanin production in callus cultures of *Rosa hybrida* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 113(3), 459–467.
-  Silja, P. K., Gisha, G. P., & Satheeshkumar, K. (2014). Enhanced plumbagin accumulation in embryogenic cell suspension cultures of *Plumbago rosea* L. following elicitation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 119(3), 469–477.
-  Sofy, A. R., Sofy, M. R., Hmed, A. A., Dawoud, R. A., Refaey, E. E., Mohamed, H. I., & El-dougDoug, N. K. (2021). Molecular Characterization of the Alfalfa mosaic virus Infecting *Solanum melongena* in Egypt and the Control of Its Deleterious Effects with Melatonin and Salicylic Acid. *Plants*, 10(459), 1–25.
-  Ubaidillah, M., & Siswoyo, T. A. (2018).



*Buku Deskripsi Plasma Nutfah Indonesia*. Deepublish.

Yelnititis, Y. (2012). Pembentukan Kalus Remah Dari Eksplan Daun Ramin (*Gonystylus bancanus* (Miq) Kurz.). *Jurnal Pemuliaan Tanaman Hutan*, 6(3), 181–194.

Yunita, L., Mufadilah, M. A., Puspito, A. N., & Ubaidillah, M. (2022). Uji Aktivitas Antimikroba Hasil Ekstraksi dari Padi Lokal. *Agriprima*, 6(2), 172–181.