Biota: Jurnal Ilmiah Ilmu-Ilmu Hayati, Vol. 8(2): 159-168, Juni 2023
p-ISSN 2527-3221, e-ISSN 2527-323X, https://ojs.uajy.ac.id/index.php/biota
DOI: 10.24002/biota.v8i2.6347

Pengaruh Konsentrasi Sukrosa terhadap Kadar Piperin pada Kalus Cabe Jawa (*Piper retrofractum* Vahl.)

The Effect of Sucrose Concentration on Piperine Content of Javanese Long Pepper (*Piper retrofractum* Vahl.) Callus

Kartika Puspita Dewi[1], Laurentius Hartanto Nugroho[2], Aries Bagus Sasongko[2*], Lisna Hidayati[2]

[1]Program Studi Biologi, Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada
Jalan Teknika Selatan, Sekip Utara, Sleman 55281, Yogyakarta, Indonesia
[2]Departemen Biologi Tropika, Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada
Jalan Teknika Selatan, Sekip Utara, Sleman 55281, Yogyakarta, Indonesia
Email: ariesbaguss@ugm.ac.id **Penulis Korespondensi*

Abstract

Javanese long pepper (*Piper retrofractum* Vahl.) is herbal plant which contains main alkaloid piperine. Its prospect as a medicine hasn't been supported by the availability of raw materials, due to low plant productivity. One of the alternatives to overcome the problem is by applying callus culture. Callus can produce secondary metabolites relatively fast and continuous. Effectiveness of secondary metabolites production such as piperine in callus culture can be obtained by increasing sucrose concentration in culture medium. This research was conducted to understand the effect of sucrose concentration on the morphology and growth of callus, also production of piperine in javanese long pepper callus. Murashige and Skoog (MS) medium, and growth regulators naphtalene acetic acid (NAA) dan benzyl amino purin (BAP) 1:2 were used to induce callus of javanese long pepper leaves. Induced calli were light green color and compact. Callus were subcultured for 35 days in MS medium containing sucrose concentration 30 g/L, 40 g/L, 50 g/L, and 60 g/L. After incubation, the callus color was changed, but the texture remained compact. The fresh and dry weight of callus were decreased by increasing sucrose concentration. Piperine in callus was extracted with ethanol 96% and its concentration was measured with Thin Layer Chromatography (TLC)-Densitometry. The enhancement of sucrose concentration did not affect piperine content in callus of javanese long pepper.

Keywords: Callus, *Piper retrofractum* Vahl., Leaf, Piperine, Sucrose

Abstrak

Cabe jawa (*Piper retrofractum* Vahl.) merupakan tanaman herbal yang mengandung alkaloid utama piperin. Prospek cabe jawa sebagai bahan obat belum didukung oleh ketersediaan bahan baku yang cukup, karena rendahnya produktivitas tanaman. Salah satu alternatif untuk mengatasi permasalahan tersebut adalah dengan menerapkan kultur kalus. Kalus dapat memproduksi metabolit sekunder relatif cepat dan berkelanjutan. Efektivitas produksi metabolit sekunder seperti piperin pada kalus dapat dilakukan dengan meningkatkan konsentrasi sukrosa dalam medium kultur. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh konsentrasi sukrosa pada morfologi kalus, pertumbuhan kalus, dan produksi piperin pada kalus cabe jawa. Medium Murashige *and* Skoog (MS), dan zat pengatur tumbuh *naphtalene asetic acid* (NAA) dan *benzyl aminopurin* (BAP) 1:2 digunakan untuk menginduksi kalus dari daun cabe jawa. Kalus yang terbentuk berwarna hijau muda dan kompak. Kalus disubkultur selama 35 hari pada medium MS dengan konsentrasi sukrosa 30 g/L, 40 g/L, 50 g/L, dan 60 g/L. Setelah inkubasi warna kalus berubah dengan tekstur tetap kompak. Berat segar dan berat kering dari kalus menurun dengan bertambahnya konsentrasi sukrosa. Piperin pada kalus diekstraksi dengan etanol 96% dan diukur kadarnya dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)-Densitometri. Peningkatan konsentrasi sukrosa pada medium kulur tidak berpengaruh pada kadar piperin dari kalus cabe jawa.

Kata kunci: Kalus, *Piper retrofractum* Vahl., Daun, Piperin, Sukrosa

Diterima: 25 Agustus 2022, Direvisi: 1 Maret 2023, Disetujui: 5 Maret 2023

Copyright© 2023. Kartika Puspita Dewi, Laurentius Hartanto Nugroho, Aries Bagus Sasongko, Lisna Hidayati

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License

How To Cite: Dewi, K. P., Nugroho, L. H., Sasongko, A. B. & Hidayatim L. (2023). Pengaruh Konsentrasi Sukrosa terhadap Kadar Piperin pada Kalus Cabe Jawa (Piper retrofractum Vahl.). Biota: Jurnal Ilmiah Ilmu-Ilmu Hayati 8(2): 159-168.

Pendahuluan

Cabe jawa (*Piper retrofractum* Vahl.) merupakan salah satu tanaman herbal yang terdistribusi di Jawa, Sumatera, Bali, Nusa Tenggara, dan Kalimantan (Sudarmaji *et al*., 2019). Cabe jawa umumnya dimanfaatkan sebagai bumbu masakan dan bahan baku obat tradisional. Salah satu senyawa metabolit khas pada tanaman ini adalah piperin. Piperin merupakan metabolit sekunder golongan alkaloid yang memiliki aktivitas farmakologis. Permintaan cabe jawa dalam industri farmasi sangat tinggi, baik kebutuhan dalam negeri maupun luar negeri. Keberadaan cabe jawa memiliki prospek tinggi dalam bidang farmasi (Bahruddin *et al.*, 2021). Namun, perbanyakan cabe jawa secara konvensional belum dapat memenuhi permintaan tersebut, akibat rendahnya produktivitas tanaman. Budidaya konvensional juga belum dapat menjamin kualitas dan kuantitas metabolit yang dihasilkan (Vasavirama *and* Upender, 2014.). Salah satu alternatif untuk mengatasi permasalahan tersebut adalah dengan menerapkan teknik kultur jaringan tumbuhan, khususnya kultur kalus. Kultur kalus dapat digunakan untuk biosintesis metabolit sekunder dalam waktu relatif cepat, tidak bergantung musim, dan berkelanjutan (Efferth, 2019).

Kelemahan kultur kalus dalam produksi metabolit sekunder adalah relatif rendahnya jumlah metabolit sekunder yang dihasilkan sehingga diperlukan modifikasi metode produksi. Optimasi medium kultur dengan penambahan konsentrasi sumber karbon, seperti sukrosa, dapat digunakan untuk mengoptimalkan produksi senyawa metabolit pada kultur kalus. Sukrosa adalah molekul disakarida yang tersusun dari glukosa dan fruktosa. Sukrosa berperan sebagai sumber karbon dan agen osmotik dalam medium kultur. Sukrosa akan terhidrolisis menjadi glukosa dan fruktosa oleh enzim invertase dalam sel. Glukosa akan memasuki proses glikolisis dan siklus Krebs untuk menghasilkan ATP sebagai pendukung pertumbuhan dan perkembangan tanaman, serta menyediakan substrat bagi biosintesis metabolit sekunder (Sari *et al.*, 2018).

Konsentrasi sukrosa dapat mempengaruhi pertumbuhan, morfologi kalus, dan produksi metabolit sekunder pada kultur kalus di sejumlah jenis tanaman. Penggunaan sukrosa 30 g/L hingga 120 g/L menunjukkan penurunan berat segar pada kultur kalus *Myrmecodia tuberosa* (Sari *et al.*, 2018). Konsentrasi sukrosa 30 g/L hingga 60 g/L menunjukkan penurunan berat segar dan kering dari kalus *Catharanthus roseus*, dengan jumlah alkaloid vinkristin dan vinblastin tertinggi pada konsentrasi sukrosa 60 g/L (Khasan *and* Al-Athary, 2016). Penelitian Shofiyani dan Purnawanto (2017), menunjukkan konsentrasi sukrosa 20 g/L hingga 40 g/L menghasilkan warna kalus kecoklatan dan lebih gelap, seiring dengan meningkatnya konsentrasi sukrosa yang diberikan. Pencoklatan juga terjadi pada kalus *Justica gendarusa* seiring dengan peningkatan konsentrasi sukrosa dan pertambahan umur kalus. Penambahan sukrosa 30 g/L, 60 g/L, 90 g/L, dan 120 g/L menghasilkan kalus *M. tuberosa* bertekstur remah (Sari *et al.,* 2018). Kalus *J. gendarusa* bertekstur kompak ditemukan pada penambahan sukrosa 10 g/L hingga 50 g/L (Wahyuni *et al.,* 2020).

Berdasarkan uraian penelitian sebelumnya tersebut, maka pada penelitian ini dilakukan analisis pengaruh konsentrasi sukrosa 30 g/L (kontrol), 40 g/L, 50 g/L, dan 60 g/L dalam medium Murashige dan Skoog (MS) terhadap pertumbuhan kalus, morfologi kalus, dan produksi alkaloid piperin pada kalus cabe jawa (*Piper retrofractum* Vahl.).

Metode Penelitian

Alat dan bahan

Alat-alat yang digunakan adalah gelas beker 1 L, timbangan analitik, *magnetic stirrer*, *stirrer bar*, *syringe*, erlenmeyer 100 mL, *shaker*, botol kultur, *autoclave*, pinset, cawan petri, skalpel no.3, *Laminar Air Flow* (German Sciences), bunsen, inkubator (ESCO), mortar, alu, mikropipet, flakon, plat silika gel 60 F_{254} Merck, TLC *Scanner* CAMAG, UV *Box,* dan *chamber* eluen.

Bahan-bahan yang digunakan adalah daun muda tanaman cabe jawa (*Piper retrofractum* Vahl.) yang diambil dari *green house,* Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada, medium Murashige *and* Skoog (MS), NAA, BAP, HCl 1 N, KOH 1 N, akuades, kertas indikator pH, sabun cuci, fungisida

(Amistar Top), etanol 70 %, sodium hipoklorit (*bleach*) 5,25%, spiritus, *plastic seal*, *alumunium foil,* etanol 96 %, *n-heksana,* etil asetat, metanol, dan piperin standar.

Rancangan percobaan dan parameter pengamatan

Penelitian ini menerapkan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan satu faktor perlakuan, yaitu penggunaan sukrosa dengan empat taraf konsentrasi (30 g/L, 40 g/L, 50 g/L, dan 60 g/L). Setiap perlakuan sebanyak tiga ulangan. Parameter yang diamati meliputi, morfologi kalus (warna dan tekstur), pertumbuhan kalus (berat segar dan berat kering), serta kadar piperin kalus.

Tahapan kerja

1. Determinasi tanaman

   Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Sistematika Tumbuhan, Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada. Determinasi dilakukan untuk memastikan sampel tanaman yang digunakan adalah cabe jawa dengan nama spesies *Piper retrofractum* Vahl.

2. Pembuatan medium induksi kalus

   Komponen medium MS masing-masing ditimbang untuk pembuatan 1 L medium. Bahan dimasukkan satu per satu, dimulai dari makronutrien, besi, mikronutrien, vitamin, zat pengatur tumbuh NAA : BAP (1:2), myo-inositol, dan sukrosa. Akuades ditambahkan hingga batas volume 1 L. pH medium diukur dan diatur hingga mencapai nilai 5,7-5,8 dengan penambahan HCl 1 N dan KOH 1 N. Agar ditambahkan pada larutan medium dan dipanaskan hingga homogen. Medium dimasukkan dalam botol kultur dan disterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C dengan tekanan 1,5 atm selama 15 menit.

3. Sterilisasi eksplan dan induksi kalus daun cabe jawa

   Eksplan daun muda dicuci dengan sabun cuci dan dibilas bersih menggunakan akuades steril. Daun disterilisasi menggunakan larutan fungisida dan di*shaker* selama 15-30 menit. Sterilisasi eksplan dilanjutkan dalam LAF, daun direndam dalam etanol 70%. Etanol dibuang dan digantikan dengan larutan sodium hipoklorit (NaOCl). Eksplan daun dibilas menggunakan akuades steril sebanyak tiga kali.

   Eksplan daun dipotong dengan ukuran 1-1,5 cm^2. Sebanyak tiga hingga empat potong daun dimasukkan dalam botol kultur berisi medium MS steril secara aseptik. Botol kultur ditutup rapat menggunakan *alumunium foil* dan *plastic seal*. Pengamatan dilakukan tiga kali dalam seminggu. Penyemprotan rak dan botol kultur secara rutin menggunakan etanol 70 % untuk mengurangi risiko kontaminasi. Kalus disubkultur ke medium yang sama, setelah berumur empat minggu atau ketika mengalami *browning* dan kontaminasi.

4. Pembuatan medium perlakuan

   Pembuatan medium MS perlakuan sama dengan proses pembuatan medium induksi kalus, yang berbeda hanya pada konsentrasi sukrosa yang ditambahkan pada masing-masing medium perlakuan, yaitu 30 g/L (kontrol), 40 g/L, 50 g/L, dan 60 g/L.

5. Subkultur perlakuan kalus daun cabe jawa

   Kalus hasil induksi dipindahkan secara aseptik pada medium MS perlakuan yang berisi sukrosa 30 g/L (kontrol), 40 g/L, 50 g/L, dan 60 g/L dengan tiga ulangan untuk tiap perlakuan. Inkubasi kalus dilakukan selama 35 hari dengan parameter yang diamati meliputi warna, tekstur, berat segar, dan berat kering kalus. Warna dan tekstur kalus diamati setiap 7 hari. Berat segar kalus diukur setiap 7 hari, sedangkan berat kering diukur pada akhir masa perlakuan dengan cara kalus dikeringkan selama ± 5-7 hari dalam inkubator bersuhu 33°C hingga mencapai berat kering konstan.

6. Ekstraksi kalus daun cabe jawa

   Kalus kering ditumbuk menjadi serbuk simplisia, ditimbang, dan dimasukkan dalam *conical tube*. Pelarut etanol 96% ditambahkan dengan perbandingan simplisia dan pelarut (1:10). Perendaman dilakukan selama 24 jam, disertai homogenisasi menggunakan bantuan *shaker*. Larutan disaring dan dipindahkan dalam flakon. Sisa pelarut diuapkan pada suhu ruang hingga diperoleh ekstrak kering.

7. Uji kadar piperin kalus daun cabe jawa

   Kadar piperin diukur secara kuantitatif menggunakan KLT-Densitometri. Ekstrak kering masing-masing ditimbang dan dilarutkan dengan metanol hingga volume 250 µL. Larutan standar piperin yang digunakan sebanyak 0,5 µL, 1 µL, 2 µL, 3 µL, 4 µL, dan 5 µL. Larutan standar dan sampel ditotolkan pada plat *silica gel* dengan jarak penotolan larutan dari sebelah kiri sebesar 1,5 cm dan dari bawah sebesar 2 cm, serta jarak antar vial 1 cm. Larutan sampel yang digunakan sebanyak tiga ulangan untuk tiap perlakuan, sehingga digunakan 18 vial. Plat *silica gel* yang telah mengandung larutan standar dan sampel dimasukkan dalam *chamber* eluen. Eluen yang digunakan adalah *n-heksana*, etil asetat, dan diklorometana dengan perbandingan (5:3:2) yang telah dijenuhkan selama 30 menit. Setelah eluen terserap dalam plat hingga mencapai jarak 2 cm dari bagian atas plat *silica gel*. Plat dikeluarkan dari *chamber eluen* dan dikering-anginkan selama 10 menit, kemudian divisualisasi pada *chamber* UV dengan panjang gelombang 336 nm dan dilakukan *scanning* menggunakan TLC *Scanner*.

Analisis data

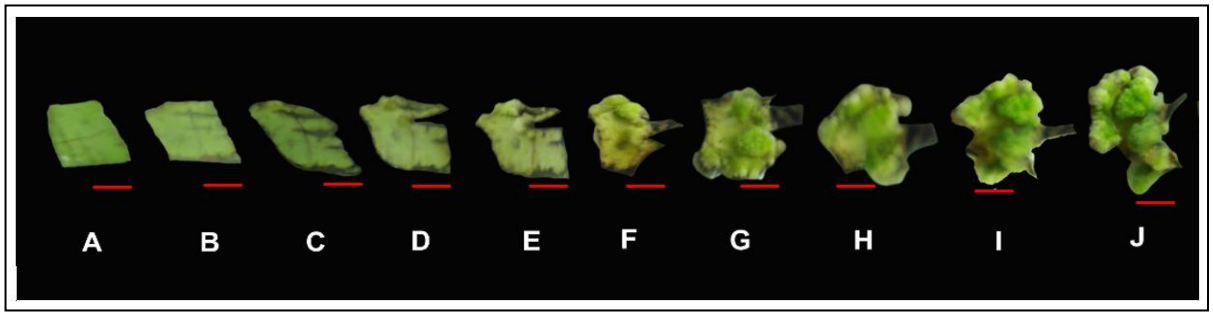
Data kualitatif berupa morfologi, warna dan tekstur kalus dianalisis secara deskriptif. Data kuantitatif, meliputi berat segar dan kering kalus, serta kadar piperin dianalisis secara statistik menggunakan uji ANOVA dan apabila terdapat perbedaan yang signifikan, dilanjutkan dengan uji *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) pada taraf kepercayaan 95 % ($p \leq 0,05$) menggunakan program IBM-SPSS 24.

Hasil dan Pembahasan

Induksi kalus daun *Piper retrofractum* Vahl.

Penelitian ini menggunakan eksplan daun muda dari tanaman cabe jawa (*Piper retrofractum* Vahl.) yang kemudian dikulturkan pada medium induksi kalus Murashige *and* Skoog (MS) dengan penambahan zat pengatur tumbuh NAA dan BAP. Berdasarkan Gambar 1. eksplan daun tampak menebal pada minggu ke-1 dan terus mengalami pembesaran hingga minggu ke-3. Pembesaran terjadi akibat penyerapan air oleh sel-sel pada eksplan. NAA mampu melenturkan dinding sel dengan memacu protein pada membran plasma untuk memompa ion H^+ menuju dinding sel. Ion H^+ mengaktivasi enzima pemutus ikatan silang hidrogen rantai molekul pada selulosa. Terputusnya ikatan tersebut akan melonggarkan dinding sel, sehingga air memasuki sel secara osmosis (Ulva *et al.,* 2019). Kalus mulai terbentuk pada minggu ke-3, ditandai dengan kemunculan bulir-bulir kecil kehijauan di bagian perlukaan eksplan. Kalus tampak menutupi keseluruhan permukaan eksplan pada minggu ke-9.

Kemunculan kalus pada bagian perlukaan disebabkan oleh aktivasi sistem pertahanan eksplan yang merubah arah jalur metabolisme dan menginduksi ekspresi gen tertentu. Kalus terbentuk sebagai mekanisme penutup luka melalui pembelahan sel yang terjadi secara terus-menerus hingga terbentuk massa sel yang tidak terdiferensiasi (Ogita, 2015). Pembelahan sel tersebut didukung oleh keberadaan BAP yang mampu mempercepat peralihan fase G1-S dan G2-M dengan meningkatkan laju sintesis protein yang dibutuhkan selama proses mitosis (Sagai *et al.,* 2016). Penelitian ini menggunakan NAA dan BAP dengan rasio 1:2 berdasarkan penelitian Rayes (2022) dan Oktaviani (2022), di mana perbandingan tersebut menunjukkan hasil optimal dalam pembentukan kalus dan biosintesis piperin pada kalus cabe jawa. Penggunaan hormon eksogen dengan perbandingan tidak seimbang mampu menginduksi pembentukan kalus, akibat adanya interaksi antara hormon eksogen dan endogen eksplan yang seimbang, sehingga terjadi aktivitas sinergis yang mampu mendukung pembentukan kalus (Mahadi *et al.*, 2014).

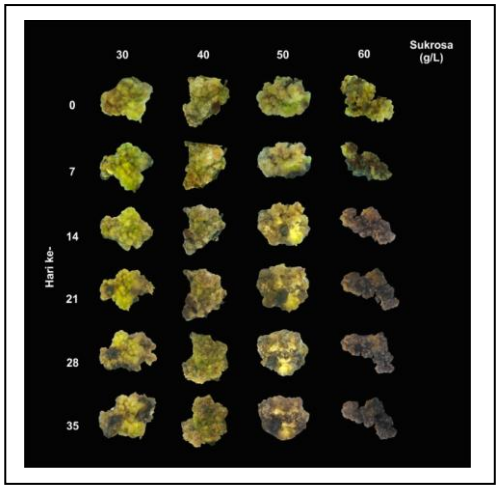


Gambar 1. Tahapan induksi kalus daun *Piper retrofractum* Vahl. (A) Hari ke-0, (B) Minggu ke-1, (C) Minggu ke-2, (D) Minggu ke-3, (E) Minggu ke-4, (F) Minggu ke-5, (G) Minggu ke-6, (H) Minggu ke-7, (I) Minggu ke-8, (J) Minggu ke-9. *Scale bar:* 1 cm

Kalus yang dihasilkan pada tahap induksi bertekstur kompak dan berwarna hijau muda (N144C). Hasil tersebut sejalan dengan penelitian sebelumnya oleh Rayes (2022) dan Oktaviani (2022). Kalus kompak tersusun atas sel-sel rapat berdinding tebal dan sulit untuk dipisahkan. Dinding sel penyusun kalus yang telah mengalami lignifikasi akan menghasilkan kalus dengan tekstur padat dan keras (Mahadi *et al.,* 2016). Warna hijau muda disebabkan oleh aktivitas sitokinin dan stimulus cahaya yang mendukung proplastid berdiferensiasi membentuk plastid yang mengandung klorofil. Keberadaan klorofil dalam plastid membuat kalus tampak berwarna hijau (Faramayuda *et al.,* 2016).

Morfologi kalus daun *Piper retrofractum* Vahl.

Kalus yang terbentuk disubkultur ke medium perlakuan yang mengandung konsentrasi sukrosa berbeda, yaitu 30 g/L (kontrol), 40 g/L, 50 g/L, dan 60 g/L. Inkubasi dilakukan selama 35 hari. Parameter yang diamati adalah morfologi kalus yang meliputi, warna dan tekstur. Perubahan morfologi kalus dapat diamati pada Gambar 2. Kalus kontrol pada konsentrasi sukrosa 30 g/L memiliki warna hijau muda (*light green*) yang lebih terang dibandingkan dengan warna sebelumnya, serta terdapat warna kecoklatan pada pada sebagian kecil tepi kalus. Kalus pada perlakuan sukrosa 40 g/L mengalami perubahan warna dari hijau muda menjadi hijau tua kecoklatan (*dark green brown*). Bagian tengah kalus masih berwarna hijau, sedangkan pada bagian tepi berwarna coklat muda. Kalus pada perlakuan sukrosa 50 g/L mengalami perubahan warna dari hijau muda menjadi coklat keabuan (*grey brown*). Bagian tengah kalus berwarna kuning kehijauan, sedangkan sebagian besar tepi kalus berwarna coklat keabuan. Kalus pada perlakuan sukrosa 60 g/L mengalami perubahan warna dari hijau muda menjadi coklat (*medium brown*), serta bagian tepi kalus berwarna kehitaman. Penentuan warna kalus tersebut didasarkan pada RHS *Color Chart* (6th *edition*) (Tabel 1).



Gambar 2. Perubahan morfologi kalus daun *Piper retrofractum* Vahl. selama masa perlakuan 35 hari

Tabel 1. Morfologi Kalus Daun *Piper Retrofractum* Vahl. pada Akhir Masa Perlakuan

Konsentrasi Sukrosa (g/L)	Morfologi Kalus		Kode Warna
	Tekstur	Warna	
30	Kompak	*Light green*	N144B
40	Kompak	*Dark green brown*	152C
50	Kompak	*Grey browm*	199B
60	Kompak	*Medium brown*	165A

Warna kalus yang berbeda pada setiap perlakuan menunjukkan bahwa kalus merespons perlakuan konsentrasi sukrosa yang diberikan. Perubahan warna kalus dapat menjadi indikator aktivitas pembelahan sel (Indah *and* Dini, 2013). Kalus pada perlakuan sukrosa 30 g/L dan 40 g/L memiliki warna hijau yang menunjukkan adanya kandungan klorofil dan merupakan kalus berkualitas baik yang aktif membelah (Salsabilla & Isda, 2022). Kalus pada perlakuan sukrosa 50 g/L berwarna kuning di bagian tengah yang menunjukkan sel masih aktif membelah atau menuju tahap akhir pembelahan aktif, sedangkan kalus pada perlakuan sukrosa 60 g/L berwarna coklat kehitaman yang menunjukkan terjadinya *browning* dan aktivitas pembelahan sel yang rendah. *Browning* juga terjadi pada bagian tepi kalus perlakuan sukrosa 30 g/L, 40 g/L, dan 50 g/L. *Browning* pada tepi kalus disebabkan oleh sel-sel bagian tepi kalus yang lebih cepat merespons perlakuan sukrosa yang diberikan, akibat permukaan sel yang berinteraksi secara langsung dengan medium.

Kemunculan *browning* ditandai dengan perubahan warna menjadi kecoklatan, baik pada kalus maupun medium. Peningkatan konsentrasi sukrosa pada medium menyebabkan perbedaan tekanan osmotik intraseluler dan ekstraseluler yang memicu terjadinya permeabilisasi membran vakuolar (tonoplas). Hal tersebut menyebabkan senyawa fenolik dalam vakuola mengalir menuju sitosol. Interaksi antara senyawa fenolik dengan enzim polifenol oksidase (PPO), serta oksigen akan memicu oksidasi fenolik membentuk senyawa quinon (Li *et al.,* 2016). Quinon adalah senyawa yang sangat reaktif dan mudah bereaksi secara spontan dan non-spesifik dalam mempolimerisasi protein atau komponen seluler lain dan membentuk pigmentasi gelap. *Browning* pada kalus dapat menyebabkan penurunan laju pertumbuhan, penurunan pembelahan sel, dan bahkan kematian sel (Li *et al.,* 2016).

Kalus yang dihasilkan pada penelitian ini memiliki warna yang lebih gelap dan coklat, seiring pertambahan umur kultur dan tingginya konsentrasi sukrosa yang diberikan. *Browning* juga ditemukan pada penelitian Wahyuni *et al.* (2020), di mana kalus *Justica gendarusa* menunjukkan peningkatan intensitas *browning*, seiring tingginya konsentrasi sukrosa. *Browning* juga ditemukan pada kalus *Kemferia galanga* pada variasi konsentrasi sukrosa (Shofiyani dan Purnawanto, 2017). Penelitian Li *et al.* (2016) menunjukkan peningkatan intensitas *browning* pada kultur *Glycyrrhiza inflata,* seiring tingginya konsentrasi sukrosa yang diberikan. Selain itu, perubahan warna kalus menjadi kecoklatan dapat disebabkan oleh degradasi klorofil. Penggunaan sukrosa pada medium akan memenuhi kebutuhan gula dalam sel, sehingga aktivitas fotosintesis akan menurun dan berakibat pada terhambatnya pembentukan klorofil.

Perlakuan sukrosa 30 g/L-60 g/L pada penelitian ini tidak menunjukkan perubahan tekstur pada kalus. Kalus kompak memiliki susunan sel yang rapat dengan dinding polisakarida yang lebih tebal dan sulit untuk dipisahkan (Anwar *and* Isda, 2020). Tekstur kompak dapat disebabkan oleh aktivitas auksin dan sitokinin yang mempengaruhi pembelahan dan pemanjangan sel, sehingga terjadi peningkatan laju pembentukan dinding sel dan kalus menjadi kompak (Mahadi *et al*., 2016). Kalus kompak dinilai efektif dalam mengakumulasi metabolit sekunder, sehingga baik digunakan dalam produksi metabolit sekunder (Indah & Dini, 2013).

Pertumbuhan kalus daun *Piper retrofractum* Vahl.

Berat segar dan berat kering merupakan parameter pertumbuhan kalus yang diukur selama masa perlakuan 35 hari. Pertumbuhan ditunjukkan dari peningkatan berat segar pada kalus yang secara fisiologis mengandung air

dan karbohidrat (Sari *et al.,* 2018). Peningkatan berat segar diperoleh dari selisih berat segar kalus pada hari ke-35 dengan berat segar kalus pada hari ke-0. Selain itu, pengukuran berat kering juga dilakukan pada akhir masa perlakuan. Berat kering diperoleh dengan cara menguapkan kandungan air pada kalus dan dilakukan pengukuran hingga diperoleh berat konstan.

Berat segar tertinggi dihasilkan oleh kalus pada perlakuan sukrosa 30 g/L (kontrol), yaitu sebesar 1,974 g, sedangkan berat segar terendah dihasilkan oleh kalus pada perlakuan sukrosa 60 g/L (Tabel 2). Peningkatan berat segar tertinggi dihasilkan oleh kalus pada perlakuan sukrosa 30 g/L, yaitu sebesar 1,242 g, sedangkan peningkatan berat segar terendah dihasilkan oleh kalus pada perlakuan sukrosa 60 g/L, yaitu sebesar 0,243 g. Medium dengan konsentrasi sukrosa melebihi 30 g/L menunjukkan hasil berat segar yang semakin menurun, jika dibandingkan dengan kalus kontrol. Berat kering yang dihasilkan oleh kalus pada perlakuan sukrosa melebihi 30 g/L juga menunjukkan penurunan, jika dibandingkan dengan kalus kontrol. Berat kering tertinggi dihasilkan oleh kalus kontrol, yaitu sebesar 0,299 g, sedangkan berat kering terendah dihasilkan oleh kalus pada perlakuan sukrosa tertinggi, yaitu sebesar 0,220 g (Tabel 2).

Hasil menunjukkan bahwa konsentrasi sukrosa sebesar 30 g/L merupakan konsentrasi optimal yang dapat mendukung pertumbuhan kalus, sedangkan konsentrasi sukrosa di atas 30 g/L menunjukkan penghambatan pertumbuhan pada kalus. Konsentrasi sukrosa di atas normal dapat memicu cekaman osmotik (Li *et al.,* 2016). Peningkatan konsentrasi sukrosa dalam medium menyebabkan perubahan pergerakan air melintasi membran sel, akibat adanya ketidakseimbangan osmolaritas antara cairan dalam sel dengan cairan di luar sel. Peningkatan konsentrasi sukrosa pada medium menyebabkan penurunan potensial air pada medium yang dapat menghambat penyerapan air dan mineral oleh sel-sel pada kalus, serta memicu keluarnya air dari dalam sel, sehingga berpengaruh pada penurunan volume sitoplasma dan vakuola sel (Kherasani *et al.,* 2017).

Penurunan potensial air medium menyebabkan turunnya turgor sel yang dapat menghambat pemanjangan dan pembelahan sel. Ketersediaan air dalam sel dapat menghambat proses pertumbuhan, karena berkurangnya kandungan air akan berpengaruh terhadap tekanan turgor dan menghambat kinerja hormon pertumbuhan, seperti auksin dan sitokinin. Cekaman osmotik yang ditimbulkan oleh sukrosa dapat mengganggu siklus sel, sehingga pembelahan sel terhambat (Hendrati *et al.,* 2016). Penelitian ini menunjukkan bahwa konsentrasi sukrosa di atas 30 g/L pada medium MS berpengaruh terhadap penurunan pertumbuhan kalus, yang ditunjukkan oleh berat segar dan berat kering kalus yang mengalami penurunan, seiring tingginya konsentrasi sukrosa yang diberikan. Hasil tersebut sejalan dengan penelitian Shofiyani dan Purnawanto (2017), di mana kalus *Kaemferia galanga* menunjukkan penurunan berat segar dan berat kering pada perlakuan sukrosa 40 g/L. Kalus *Lycopersicon esculentum* juga menghasilkan rerata berat segar dan kering tertinggi pada konsentrasi sukrosa 30 g/L dan menurun pada konsentrasi 40 g/L (Ulva *et al.,* 2019).

Tabel 2. Berat Segar dan Berat Kering Kalus Daun *Piper Retrofractum* Vahl. selama Masa Perlakuan

Konsentrasi Sukrosa (g/L)	Berat Segar pada Hari ke-35 (g)	Peningkatan Berat Segar (g)	Berat Kering (g)
30	$1,974 \pm 0,146^{c}$	$1,242 \pm 0,167^{c}$	$0,299 \pm 0,038^{b}$
40	$1,624 \pm 0,161^{b}$	$0,917 \pm 0,165^{b}$	$0,253 \pm 0,020^{ab}$
50	$1,488 \pm 0,233^{b}$	$0,743 \pm 0,217^{b}$	$0,280 \pm 0,018^{b}$
60	$0,960 \pm 0,024^{a}$	$0,243 \pm 0,027^{a}$	$0,220 \pm 0,017^{a}$

Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama, pada kolom yang sama, menunjukkan hasil yang berbeda tidak nyata berdasarkan uji DMRT pada tingkat kepercayaan 95%

Tabel 3. Kadar Piperin Ekstrak Kalus Daun *Piper retrofractum* Vahl.

Konsentrasi Sukrosa (g/L)	Kadar Piperin (%)
30	0,006 ± 0,004[a]
40	0,012 ± 0,006[a]
50	0,007 ± 0,006[a]
60	0,004 ± 0,001[a]

Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama, pada kolom yang sama, menunjukkan hasil yang berbeda tidak nyata berdasarkan uji DMRT pada tingkat kepercayaan 95%

Penurunan pertumbuhan kalus pada perlakuan sukrosa di atas 30 g/L dapat disebabkan oleh kandungan sukrosa yang tinggi. Sukrosa yang tinggi pada medium dapat menghasilkan kalus bertekstur kompak. Sukrosa memiliki peran dalam pembentukan dinding sel yang terdiri dari rantai selulosa yang sulit untuk diputuskan. Kalus yang terlalu kompak memiliki kemampuan penyerapan zat hara atau nutrien yang lebih rendah, sehingga laju pertumbuhan kalus kurang optimal (Junairiah *et al.,* 2018). Kemunculan *browning* pada kalus juga ikut berperan dalam penurunan pertumbuhan kalus. Peningkatan konsentrasi sukrosa pada medium menyebabkan perbedaan tekanan osmotik intraseluler dan ekstraseluler yang memicu terjadinya permeabilisasi tonoplas. Hal tersebut menyebabkan senyawa fenolik dalam vakuola mengalir menuju sitosol dan berinteraksi dengan enzim PPO memicu oksidasi fenolik membentuk senyawa quinon. Quinon sangat reaktif dan mudah bereaksi secara spontan dan non-spesifik dalam mempolimerisasi protein atau komponen seluler lain dan membentuk pigmentasi gelap (Li *et al.,* 2016). *Browning* ditemukan pada semua perlakuan sukrosa, namun dengan intensitas yang berbeda. *Browning* ringan ditemukan pada kalus kontrol dan intensitasnya semakin meningkat, seiring tingginya konsentrasi sukrosa yang diberikan. *Browning* pada keseluruhan permukaan kalus ditemukan pada kalus dengan perlakuan sukrosa tertinggi, yaitu 60 g/L. Kemunculan *browning* juga ditemukan pada penelitian Wahyuni *et al.* (2020), di mana kalus *Justica gendarusa* menunjukkan peningkatan intensitas *browning,* seiring tingginya konsentrasi sukrosa.

Kadar piperin ekstrak kalus daun *Piper retrofractum* Vahl.

Penentuan kadar piperin kalus dilakukan menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Densitometri dengan plat KLT silika *gel* 60 F_{254} sebagai fase diam dan larutan *n*-heksana, etil asetat, diklorometan (5:3:2) sebagai fase gerak. Ketiga fase gerak tersebut bersifat semipolar, sehingga dapat memisahkan piperin yang bersifat semipolar dari kandungan lain dalam ekstrak (Hikmawanti *et al*., 2016). Persamaan regresi kurva kalibrasi yang diperoleh pada penelitian adalah y = 63459x + 354,07 dengan nilai koefisien determinasi (R^2) sebesar 0,9939. Kurva kalibrasi tersebut digunakan untuk menentukan konsentrasi piperin dalam sampel. Kadar piperin pada seluruh perlakuan sukrosa menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata (Tabel 3).

Peningkatan konsentrasi sukrosa di atas 30 g/L bertujuan untuk menginduksi cekaman osmotik pada sel-sel kalus. Cekaman merupakan salah satu efektor dalam peningkatan produksi metabolit sekunder, termasuk senyawa golongan alkaloid. Ketika mengalami cekaman, metabolisme primer akan beralih ke metabolisme sekunder untuk produksi senyawa metabolit sekunder, sehingga terjadi hambatan pertumbuhan. Keberadaan metabolit sekunder berperan penting dalam pertahanan dan adaptasi terhadap cekaman. Metabolit sekunder berperan sebagai antioksidan dan komponen penguat dinding sel selama cekaman (Yang *et al.,* 2018). Meskipun senyawa piperin memiliki aktivitas antioksidan yang kuat (Kumar *et al.,* 2018). Aplikasi konsentrasi sukrosa melebihi 30 g/L pada penelitian ini belum menunjukkan pengaruh terhadap peningkatan produksi senyawa alkaloid piperin pada kalus cabe jawa. Hasil serupa juga ditunjukkan pada penelitian Nishanth *et al.* (2018), dimana sintesis alkaloid vinblastin kalus *Catharanthus roseus* tidak menunjukkan hasil signifikan pada perlakuan sukrosa eksogen.

Sintesis senyawa piperin yang tidak signifikan dapat disebabkan oleh fenilalanin yang juga terlibat dalam biosintesis senyawa metabolit sekunder lain. Penggunaan bersama fenilalanin dapat menyebabkan tidak

optimalnya produksi senyawa piperin, akibat terjadinya kompetisi penggunaan fenilalanin sebagai prekursor pada biosintesis metabolit sekunder. Fenilalanin berperan dalam pembentukan prekursor piperin, yaitu *cinnamoyl*-CoA (Okwute & Egharevba, 2013). Selain terlibat dalam pembentukan prekursor piperin, fenilalanin juga berperan sebagai prekursor dalam pembentukan fenolik, flavonoid, kumarin, lignin, lignan, antosianin, dan tanin (Pascual *et al.,* 2016). Kemunculan *browning* pada kalus dengan intensitas yang semakin meningkat, seiring tingginya konsentrasi sukrosa juga menunjukkan bahwa terdapat akumulasi senyawa fenolik selama cekaman berlangsung. Senyawa fenolik juga memiliki aktivitas antioksidan sebagai mekanisme pertahanan terhadap cekaman (Valifard *et al.,* 2014).

Simpulan dan Saran

Peningkatan konsentrasi sukrosa pada medium Murashige *and* Skoog (MS) menghasilkan kalus dengan warna *light green* (30 g/L sukrosa), *dark green brown* (40 g/L), *grey brown* (50 g/L), *medium brown* (60 g/L) dengan tekstur kompak. Penurunan berat segar dan kering kalus terjadi seiring meningkatnya konsentrasi sukrosa. Peningkatan konsentrasi sukrosa tidak menunjukkan pengaruh terhadap jumlah piperin pada kalus *Piper retrofractum* Vahl.

Daftar Pustaka

Anwar, N. & Isda, M.N. (2020). Respons pembentukan kalus daun pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urb.) dengan penambahan *Naphtalene Acetic Acid* dan *Benzil Amino Purin* secara *in vitro. Biota:Jurnal Ilmiah Ilmu-Ilmu Hayati* 5(2):136-142.

Bahruddin, A., Zaka, U., Sholah, Mudarris. & Aziz, A. (2021). Pemanfaatan dan prospek budidaya cabe jamu di Dusun Nung Malaka Desa Daleman Kecamatan Galis Kabupaten Bangkalan. *Dharma: Jurnal Pengabdian Masyarakat* 1(2):108-126.

Efferth, T. (2019). Biotechnology applications of plant callus cultures. *Engineering* 5: 50-59.

Faramayuda, F., Elfahmi, Ramelan, R. S. (2016). Optimasi induksi kalus tanaman cabe jawa (*Piper retrofractum* Vahl.) dengan berbagai variasi zat pengatur tumbuh. *Kartika-Jurnal Ilmiah Farmasi* 4(2): 21-25.

Hendrati, R.L., Rachmawati, D. & Pamuji, A.C. (2016). Respon kekeringan terhadap pertumbuhan, kadar prolin, dan anatomi akar *Acacia auriculiformis* Cunn., *Tectona grandis* L., *Alstonia spectabilis* Br., dan *Cedrela odorata* L. *Jurnal Penelitian Kehutanan Wallacea* 5(2): 123-133.

Hikmawanti, N. P. E., Hariyanti, Aulia, C. & Viransa, V. P. (2016). Kandungan piperin dalam ekstrak buah lada hitam dan buah lada putih (*Piper nigrum* L.) yang diekstraksi dengan variasi konsentrasi etanol menggunakan metode KLT-densitometri. *Media Farmasi* 13(2): 173-185.

Indah, P.N. & Dini, E. (2013). Induksi kalus daun nyamplung (*Calophyllum inophyllum* Linn.) pada beberapa kombinasi konsentrasi 6-*Benzylaminopurine* (BAP) dan 2,4-*Dichlorophenoxyacetic Acid* (2,4-D). *Jurnal Sains dan Seni Pomits* 2(1): 1-6.

Junairiah, Sofiana, D.A., Manuhara, Y.S.W. & Surahmaida. (2018). Induksi kalus *Piper retrofractum* Vahl. dengan zat pengatur tumbuh auksin dan sitokinin. *Journal of Pharmacy and Science* 3(2):41-46.

Khasan, K.T. & Al-Athary, M. A. H. (2016). Vinblastine and vincristine alkaloids production from callus of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. under some abiotic factors. *Al-Kufa Journal for Biology* 8(2): 75-90.

Kherasani, I., Prihastanti, E. & Haryanti, S. (2017). Pertumbuhan kalus eksplan rimpang jahe merah (*Zingiber officinale* Rosc.) pada berbagai konsentrasi sukrosa secara *in vitro. Buletin Anatomi dan Fisiologi* 2(1): 43-49.

Kumar, S., Bhandari, C., Sharma, P. & Agnihotri, N. (2018). *Role of Piperine in Chemoresistance.* Elsevier.

Li, Y., Meng, T., Wang, Y. & Zhang, X. (2016). Study on enzymatic browning in suspension cultures of licorice cells. *Biotechnology and Biotechnological Equipment* 30(2): 277-283.

Mahadi, I., Wulandari, S. & Omar, A. (2014). Pembentukan kalus tanaman *Rosella* (*Hibiscus sabdariffa*) pada pemberian

Naphtalene Acetyl Acid (NAA) dan Benzyl Amino Purin (BAP) sebagai sumber belajar konsep bioteknologi. *Jurnal Biogenesis* 11(1): 1-6.

Mahadi, I., Syafi, I.W. & Sari, Y. (2016). Induksi kalus jeruk kasturi (*Citrus microcarpa*) menggunakan hormon 2,4-D dan BAP dengan metode *in vitro. Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia (JIPI)* 21(2): 84-89.

Nishanth, M.J., Sheshadri, S.A., Rathore, S.S., Srinidhi, S. & Simon, B. (2018). Expression analysis of cell wall invertase under abiotic stress conditions influencing specialized metabolism in *Catharanthus roseus. Scientific Reports* 8: 1-16.

Pascual, M.B., El-Azaz, J., de la Torre, F.N., Canas, R.A., Avila, C. & Canovas, F.M. (2016). Biosynthesis and metabolic fate of phenylalanine in conifers. *Frontiers in Plant Science* 7(1030): 1-13.

Ogita, S. (2015). Plant cell, tissue and organ culture: the most flexible foundations for plant metabolic engineering applications. *Nat. Prod. Commun* 10(5): 815□820.

Oktaviani, D. (2022). *Profil Metabolit Sekunder Kalus Hasil Mikropropagasi Tanaman Cabai Jawa (Piper Retrofractum Vahl.) secara In Vitro* [Skripsi]. Universitas Gadjah Mada.

Okwute, S. K. & Egharevba, H. O. (2013). Piperine-type amides: review of the chemical and biological characteristics. *International Journal of Chemistry* 5(3): 99-122.

Rayes, F. D. P. (2022). *Pengaruh Ekstrak Kalus Cabai Jawa (Piper Retrofractum Vahl.) Hasil Kultur In Vitro terhadap Pertumbuhan Bakteri Escherichia Coli* [Skripsi]. Universitas Gadjah Mada.

Salsabila, M. J. & Isda, M. N. (2022). Induksi kalus dari eksplan daun tacca (*Tacca chantrieri* Andre) pada media Murashige and Skoog dengan konsentrasi sukrosa yang berbeda secara *in vitro. Jurnal Biologi Universitas Andalas* 10(1): 1-9.

Sari, Y. P., Kusumawati, E., Saleh, C., Kustiawan, W. & Sukartiningsih. (2018). Effect of sucrose and plant growth regulators on callogenesis ad preliminary secondary metabolic of different explant *Myrmecodia tuberosa. Nusantara Bioscience* 10(3): 183-192.

Shofiyani, A. & Purnawanto, A. M. (2017). Pertumbuhan kalus kencur (*Kaemferia galanga* L.) pada komposisi dengan perlakuan sukrosa dan zat pengatur tumbuh (2,4-D dan BenzilAminopurin). *Agritech* 19(1): 55-64.

Sudarmaji, L., Hayati, A. & Rahayu, T. (2019). Studi etnobotani tanaman cabe jamu (*Piper retrofractum* Vahl.) di desa gapura timur kecamatan gapura kabupaten semenep. *Jurnal Ilmiah BIOSAINTROPI* 4: 26-32.

Ulva, M., Nurchayati, Y., Prihastanti, E. & Setiari, N. (2019). Pertumbuhan kalus tomat (*Lycopersicon esculentum* Linn.) varietas permata F1 dari jenis eksplan dan konsentrasi sukrosa yang berbeda secara *in vitro. Life Science* 8(2): 160-170.

Valifard, M., Mohsenzadeh, S., Kholdebarin, B. & Rowshan, V. (2014). Effects of salt stress on volatile compounds, total phenolic content, and antioxidant activities of *Salvia mirzayanii. S. Afr. J. Bot.* 93: 92-97.

Vasavirama, K. & Upender, M. (2014). Piperine : a valuable alkaloid from *Piper* species. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 6(4): 34-38.

Wahyuni, D. K. A., Huda, S., Faizah, H., Purnobasuki. & Wardoyo, B. P. E. (2020). Effects of light, sucrose concentration and repetitive subculture on callus growth and medically important production in *Justicia gendarussa* Burm.F. *Biotechnology Reports* 27: 1-9.

Yang, L., Wen, K.S., Ruan, X., Zhao, Y.X., Wei, F. & Wang, Q. (2018). Response of plant secondary metabolites to environmental factors. *Molecules* 23(4): 762.