



HASIL PENELITIAN

POTENSI EKSTRAK KALUS TANAMAN BAWANG PUTIH TUNGGAL (*Allium sativum* L.) HASIL *IN VITRO* SEBAGAI ANTIOKSIDAN

Diusulkan oleh:

Dr. YANTI PUSPITA SARI, M.Si

Dr. RATNA KUSUMA, M.Si

Dr. CHAIRUL SALEH, M.Si

Ketua / NIDN: 0004037404

Anggota / NIDN : 0016046303

Anggota / NIDN: 0031037302

**SKM BANTUAN BIAYA
PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT
PENDANAAN BOPTN TAHUN ANGGARAN 2019**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS MULAWARMAN
2019**

HALAMAN PENGESAHAN

**Judul : POTENSI EKSTRAK KALUS TANAMAN BAWANG PUTIH
TUNGGAL (*Allium sativum* L.) HASIL IN VITRO SEBAGAI
ANTIOKSIDAN**

Ketua Tim

a. Nama Lengkap, Gelar : Dr. Yanti Puspita Sari, M.Si
b. NIP / NIDN : 19740304 200012 2001 / 0004037404
c. Jabatan Fungsional : Lektor Kepala
d. Jurusan / Program Studi : Biologi
e. Alamat Email : ypsman2002@yahoo.com
f. Nomor Handphone : 081253958381

Anggota 1

a. Nama Lengkap, Gelar : Dr. Hj. Ratna Kusuma, M.Si
b. NIP / NIDN : 19630416 198903 2 001 / 0016046303
c. Jabatan Fungsional : Lektor kepala
d. Jurusan / Program Studi : Biologi

Anggota 2

a. Nama Lengkap, Gelar : Dr. Chairul Saleh, S.Si., M.Si
b. NIP / NIDN : 197303312000121001 / 0031037302
c. Jabatan Fungsional : Lektor Kepala
d. Jurusan / Program Studi : Kimia

Usulan Biaya : Rp. 22.500.000,-
Jangka Waktu Pelaksanaan : 6 (enam) Bulan

Samarinda, 30 Agustus 2019

Mengetahui,

Ketua Jurusan Biologi

Ketua Tim Peneliti

Dr. Dwi Susanto, M.Si
NIP. 19711205 200212 1 002

Dr. Yanti Puspita Sari, M.Si
NIP. 19740304 200012 2 001

Menyetujui,

Dekan Fakultas MIPA Universitas Mulawarman

Dr. Eng. Idris Mandang, M.Si.
NIP. 19711008 199802 1 001

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
DAFTAR ISI	iii
RINGKASAN	v
BAB 1. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan Penelitian.....	2
1.4 Manfaat Penelitian	2
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Tinjauan Umum Bawang Putih (<i>Allium sativum</i> L.).....	4
2.2 Kultur Jaringan.....	5
2.3 Kultur Kalus	6
2.4 Metabolit Sekunder	7
2.5 Sintesis Sukrosa Menjadi Metabolit Sekunder	8
BAB 3. METODE PENELITIAN	
3.1 Waktu dan Tempat	10
3.2 Alat dan Bahan	10
3.2.1 Pembentukan Kalus	10
3.2.2 Ekstraksi Sampel	10
3.2.3 Uji Fitokimia.....	10
3.3 Rancangan Penelitian	10
3.3.1 Pembentukan Kalus	10
3.4 Cara Kerja	10
3.4.1 Sterilisasi Alat.....	10
3.4.2 Pembuatan Media MSo.....	11
3.4.3 Persiapan dan Penanaman Eksplan.....	11
3.4.3.1 Sterilisasi Eksplan	11
3.4.3.2 Penanaman Eksplan.....	11
3.4.3.3 Subkultur Kalus.....	11
3.5 Pembuatan Ekstrak.....	11
3.6 Uji Fitokimia	12
3.6.1 Uji Kualitatif.....	12
3.6.1.1 Persiapan Sampel.....	12
3.6.1.2 Pembuatan Reagen.....	12
3.6.2 Uji Antioksidan	12
3.7 Parameter Pengamatan	13
3.8 Analisis Data	13
BAB 4. BIAYA DAN JADWAL PENELITIAN	
4.1. Morfologi Kalus.....	15
4.2. Jadwal Penelitian.....	16
4.3. Uji Metabolit Sekunder Kalus Bawang Putih (<i>Allium sativum</i> L.)	17

4.3.1 Uji Fitokimia.....	18
4.3.2 Aktifitas Antioksidan Kalus Bawang Putih Tunggal (<i>Allium sativum</i> L)	19
BAB 5. PENUTUP	
5.1 Kesimpulan.....	21
5.2 Saran	21
DAFTAR PUSTAKA.....	22
LAMPIRAN.....	26

RINGKASAN

Tanaman bawang putih tunggal (*Allium sativum* L.) merupakan tanaman obat yang diketahui memiliki lebih dari 2000 senyawa aktif yang terdapat dalam umbinya. Konsentrasi senyawa tertinggi dalam bawang putih yaitu senyawa sulfur termasuk allicin (thio- 2-propena-1- asam sulfinat S - allyl ester) diketahui sebagai komponen aktif utama. Allicin memiliki berbagai sifat biologi dan farmakologis, seperti antikoagulasi, antihipertensi, antimikroba, antibiotik, antiparasit, antimikotik, antivirus, antitumoral, antioksidan, antipenuaan, antiplatelet, mendetoksifikasi logam berat, fibrinolisis, hypolipidaemik (penurun lipid) dan penambah kekebalan tubuh.

Hasil produksi bawang putih tunggal tidak dapat memenuhi permintaan konsumen yang tinggi yaitu sekitar 20-30% pertahun. Oleh sebab itu dibutuhkan cara perbanyakan tanaman yang mampu menghasilkan tanaman dalam jumlah yang besar, dan penyediaan bahan khususnya dalam skala industri untuk dijadikan obat. Teknik kultur jaringan dapat menghasilkan tanaman bawang putih tunggal dalam jumlah yang banyak dan dalam waktu yang relatif singkat. Selain untuk budidaya tanaman, kultur jaringan juga digunakan untuk memproduksi dan meningkatkan kandungan metabolit sekunder tanaman sebagai bahan pembuatan obat-obatan. Untuk pengujian kandungan metabolit sekunder biasanya sumber eksplan yang digunakan adalah kultur kalus. Informasi ilmiah penggunaan metabolit sekunder dari ekstrak kalus dalam menghasilkan senyawa antioksidan (yang berpotensi sebagai antikanker) masih sangat kurang, biasanya sumber bahan baku selalu menggunakan langsung dari alam.

Tujuan jangka panjang penelitian ini adalah mendapatkan ekstrak kalus tanaman bawang putih tunggal terbaik yang mempunyai nilai aktivitas antioksidan yang tinggi sehingga dapat digunakan untuk menghambat pertumbuhan sel kanker. Seperti diketahui bahwa kanker merupakan salah satu penyebab kematian tertinggi di dunia. Sedangkan target khusus yang diharapkan adalah penggunaan kalus tanaman bawang putih tunggal dapat dijadikan alternatif pengganti bahan baku obat yang selama ini selalu di dapat dari alam. Selain untuk menjaga keberlangsungan hidup tanaman potensial di alam agar tidak punah, dengan menggunakan kalus dan penambahan prekursor tertentu ke dalam media dapat meningkatkan kandungan metabolit sekunder dibandingkan tanaman asli di alam.

Adapun metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah perbanyakan kalus tanaman bawang putih tunggal secara *in vitro* dengan penambahan zat pengatur tumbuh picloram, serta penambahan sukrosa dengan konsentrasi tertentu (30, 60, 90 dan 120 gram) untuk menghasilkan metabolit sekunder tertinggi yang dilihat dari nilai Total Phenolik Content (TPC), Total flavonoid Content (TFC) dan aktivitas antioksidan.

Kata kunci: tanaman bawang putih tunggal, kalus, *in vitro*, metabolit sekunder, antioksidan,

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1.Latar Belakang

Allium sativum L., atau yang biasa dikenal dengan bawang putih, termasuk ke dalam keluarga bawang-bawangan (*Alliaceae*). Bawang putih telah lama digunakan sebagai rempah-rempah penyedap makanan dan bahan obat. Dunia kesehatan telah banyak memberikan informasi mengenai khasiat dari bawang putih sebagai obat. *A. sativum* memiliki berbagai aktivitas biologis termasuk antioksidan, pencegahan kanker, perlindungan hati, imunomodulasi dan pengurangan faktor risiko penyakit kardiovaskular. Bawang putih diketahui memiliki kandungan lebih dari 2000 senyawa aktif biologis yang terkandung didalam umbinya (Utami dan Mardana, 2013).

Jenis bawang putih tunggal mempunyai potensi sebagai obat herbal yang relatif lebih besar dibandingkan bawang putih biasa, tetapi hasil produksinya tidak dapat memenuhi permintaan konsumen yang tinggi yaitu sekitar 20-30% pertahunnya (Utami dan Mardana, 2013). Oleh sebab itu dibutuhkan cara perbanyak tanaman yang mampu menghasilkan anakan dalam jumlah yang besar, khususnya dalam skala industri untuk dijadikan obat.

Salah satu metode yang dapat digunakan untuk perbanyak tanaman adalah kultur *in vitro*. Kultur *in vitro* adalah suatu metode untuk mengisolasi seperti protoplas, sel jaringan, embrio atau organ tanaman, kemudian menumbuhkan dalam kondisi aseptik dalam wadah yang transparan (botol gelas atau tabung reaksi). Kendala dalam penyediaan bibit dapat teratasi dengan teknik kultur jaringan karena dapat menyediakan bibit dalam jumlah banyak dalam waktu singkat (Abbas, 2011).

Perbanyak kultur jaringan secara tidak langsung dapat melalui kalus. Kalus adalah massa sel yang belum terdiferensiasi, terdiri dari sel parenkim yang muncul dari sel jaringan induk yang sedang membelah dan biasanya terjadi ditempat irisan untuk menutupi luka pada eksplan. Kalus didapatkan dari eksplan yang diisolasi dan ditumbuhkan dalam lingkungan steril, pembentukan kalus terinduksi dari bagian tanaman tertentu dengan memberikan zat tumbuh (Maharajan *et al*, 2010: Budiayati, 2002).

Beberapa faktor yang mempengaruhi keberhasilan kultur jaringan adalah media tanam, zat pengatur tumbuh (zpt), sumber eksplan yang digunakan dan faktor lingkungan. Jenis dan variasi konsentrasi zat pengatur tumbuh yang ditambahkan ke dalam media sangat menentukan keberhasilan teknik kultur jaringan (Shi, 2014). Zpt yang dapat digunakan untuk menumbuhkan kalus adalah jenis zpt picloram dan 2,4 D. Picloram adalah salah satu jenis auksin yang biasanya digunakan untuk pertumbuhan kalus. Dalam kultur jaringan zpt golongan auksin dalam konsentrasi rendah akan meningkatkan pembentukan tunas adventif tetapi dalam konsentrasi tinggi akan merangsang pembentukan kalus dan menekan morfogenesis (Zulkarnain, 2009). Menurut Sivanesan (2015) penambahan auksin seperti picloram dan 2,4 D paling baik dalam menginduksi kalus embrionik dari berbagai macam eksplan bawang.

Kalus yang terbentuk selain digunakan untuk perbanyak tanaman dapat juga digunakan untuk mengetahui kadar kandungan aktif (metabolit sekunder) di dalam tanaman (Subroto dan Saputro, 2008). Pada umumnya untuk mempelajari sintesis metabolit sekunder secara *in vitro* yang sering digunakan adalah kultur organ, kultur suspensi sel dan kultur kalus (Manthell dan Smith, 1983). Kandungan metabolit sekunder yang dihasilkan dari kultur kalus sama bahkan kadang kadarnya lebih tinggi dari pada metabolit yang diambil langsung dari tanamannya, sehingga dapat menjadi

alternatif penyediaan bahan baku obat tanpa harus mengambil tanaman langsung dari alam (Anggraeni, 2007).

Sari, dkk (2016) menyatakan bahwa kalus yang dihasilkan melalui kultur jaringan memiliki kandungan metabolit sekunder yang sama dengan tumbuhan sarang semut yang terdapat di alam sehingga dapat digunakan sebagai bahan pengganti untuk mendapatkan senyawa metabolit sekunder dan tidak perlu mengambil langsung tanaman yang berasal dari alam. Hal ini merupakan suatu usaha untuk penyelamatan plasma nutfah tanaman.

Menurut Anggraeni (2007) salah satu cara yang dapat dilakukan untuk meningkatkan pertumbuhan kalus dalam memproduksi metabolit sekunder adalah dengan menambahkan pra zat ke dalam media, salah satunya adalah sukrosa. Sukrosa merupakan sumber karbon yang berfungsi sebagai sumber energi yang dibutuhkan oleh sel untuk dapat melakukan pertumbuhan. Konsentrasi sukrosa berpengaruh terhadap pertumbuhan kalus (Sitorus, dkk., 2011). Beberapa penelitian tentang penambahan sukrosa untuk meningkatkan kandungan metabolit sekunder pada tanaman telah dilakukan pada beberapa penelitian diantaranya penelitian Nurchayati dan Afiah (2010) penambahan sukrosa 20g/L sudah menunjukkan adanya kandungan metabolit sekunder yaitu asam askorbat pada kalus *Hibiscus sabdarifa* L.

Sejauh ini belum ada informasi maupun penelitian mengenai aktivitas antioksidan ekstrak kalus tanaman bawang putih tunggal hasil *in vitro* sehingga penelitian ini perlu dilakukan, untuk mengetahui ekstrak kalus dengan pelarut terbaik dalam menghasilkan aktivitas antioksidan yang dipercaya dapat menangkal radikal. Diharapkan penelitian ini bermanfaat sebagai informasi ilmiah di bidang farmasi dan industri obat-obatan bahwa bahan baku obat tidak harus diperoleh dari tanaman langsung di alam tetapi bisa menggunakan teknik *in vitro*. Informasi ini juga diharapkan bermanfaat di bidang konservasi tanaman khususnya jenis tanaman potensial agar bisa dimanfaatkan tanpa merusak populasi.

Berdasarkan informasi tersebut maka akan dilakukan penelitian mengenai pengaruh kadar sukrosa terhadap pertumbuhan kalus dan senyawa metabolit sekunder tanaman bawang putih tunggal (*A. sativum* L.).

1.2.Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian di atas beberapa masalah yang akan dijawab dengan penelitian ini adalah : 1) apakah pemberian sukrosa dengan konsentrasi yang berbeda (30, 60, 90 dan 120 g/L) akan berpengaruh terhadap pembentukan kalus yang optimum? 2) apakah pemberian sukrosa yang berbeda mempengaruhi kandungan metabolit sekunder yang dihasilkan kalus tanaman bawang putih tunggal yang dilihat dari nilai TPC, TFC dan aktivitas antioksidan?

1.3.Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan mengetahui dan mengungkapkan potensi yang dimiliki oleh ekstrak kalus tanaman bawang putih tunggal sebagai tanaman obat yang mempunyai antioksidan yang tinggi sehingga berpotensi sebagai antikanker, antihipertensi, dan lain-lain. Secara spesifik tujuan penelitian ini adalah 1) untuk menghasilkan kalus tanaman bawang putih tunggal dengan penambahan zat pengatur tumbuh Picloram, dan 2) untuk meningkatkan pertumbuhan kalus dan kandungan metabolit sekundernya dengan penambahan sukrosa (30, 60, 90 dan 120 g/L)

1.3. Manfaat Penelitian

Dapat digunakan sebagai dasar dalam pengembangan produksi bahan-bahan dasar obat bermanfaat yang berasal dari kalus tanaman bawang putih tunggal.

1.4. Kontribusi Mendasar Pada Suatu Bidang Ilmu

Penggunaan tanaman sebagai sumber bahan baku obat telah banyak dilakukan untuk mengobati berbagai macam penyakit. Tetapi pemanfaatan tanaman tanpa adanya upaya budidaya mengakibatkan kelimpahan tanaman di alam menjadi berkurang dan permintaan konsumen menjadi tidak terpenuhi. Alternatif penggunaan teknik kultur dalam menghasilkan sumber bahan baku obat tanaman merupakan salah satu cara untuk menjaga kelestarian genetik tanaman.

1.5. Target Luaran

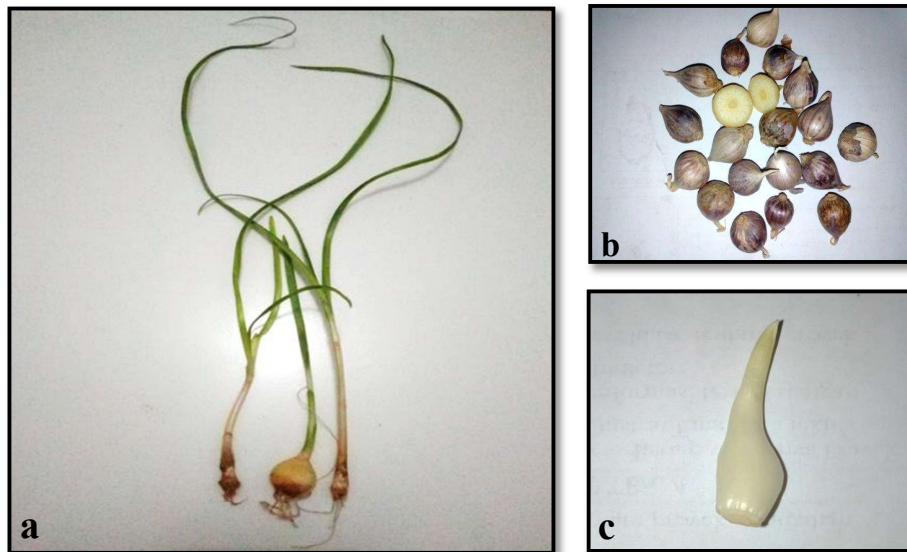
- Jurnal Internasional bereputasi
- Seminar nasional/Internasional

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Umum Bawang Putih (*Allium sativum* L.)

Allium sativum L., umumnya dikenal sebagai bawang putih, termasuk dalam kelompok famili bawang (Alliaceae). Berdasarkan jumlah umbinya, bawang putih dapat dibedakan atas bawang putih bersiung banyak dan bawang putih bersiung tunggal. Umbi bawang putih yang bersiung tunggal disebut dengan bawang lanang (bawang putih tunggal) (Utami dan Mardana, 2013).

Bawang putih tunggal (lanang) sebenarnya merupakan varietas yang terbentuk secara tidak sengaja karena lingkungan penanaman yang tidak cocok. Tanaman ini pertama ditemukan di daerah Sarangan, Magetan, Jawa Timur. Umbi tanaman ini hanya berisi satu umbi utuh yang kecil. Hal ini disebabkan bawang tersebut hanya mampu membentuk tunas utama di tajuk dan menekan pembentukan tunas-tunas bakal siung (Syamsiah dan Tajudin, 2005).



Gambar 2.1. a). Tanaman Bawang Putih Tunggal, b). Umbi c). Embrio
(sumber: dokumentasi pribadi)

Bawang putih dengan siung tunggal memiliki perbedaan dengan bawang putih biasa, antara lain: perbedaan dari rasa, warna, bau dan teksturnya. Bawang bawang putih tunggal bersiung tunggal, memiliki rasa yang sangat kuat dan lebih tajam dibandingkan bawang putih siung banyak, warna bawang putih tunggal sedikit lebih pekat berwarna putih kekuningan dibandingkan bawang putih bersiung banyak yang berwarna lebih terang, serta bawang putih tunggal memiliki tekstur berupa serbuk kasar, bau yang terdapat pada kedua bawang putih tersebut dikarenakan adanya kandungan alliaeous (Bharat *et al*, 2014).

Menurut Lemmens dan Bunyapraphatsara (2003), tanaman bawang putih tunggal diklasifikasi sebagai berikut:

kingdom : Plantae
divisi : Spermatophyta

kelas : Liliopsida
ordo : Liliales
famili : Liliaceae
genus : Allium L.
spesies : *Allium sativum* L.

Pada umumnya bawang putih dapat digunakan untuk rempah-rempah dan kesehatan. *Allium sativum* telah digunakan berbagai kegiatan biologi termasuk antioksidan, pencegahan kanker, perlindungan hati, peningkatan imunitas dan faktor pengurangan risiko penyakit kardiovaskular. Bawang putih tergolong bersifat obat karena mengandung lebih dari 2000 senyawa aktif. Konsentrasi senyawa tertinggi dalam bawang putih yaitu senyawa sulfur. Senyawa sulfur, termasuk allicin (thio- 2-propena-1- asam sulfinat S - allyl ester) diketahui sebagai komponen aktif utama dalam bulbi dari tanaman bawang putih. Allicin memiliki berbagai sifat biologi dan farmakologis, seperti antikoagulasi, antihipertensi, antimikroba, antibiotik, antiparasit, antimikotik, antivirus, antitumoral, antioksidan, anti-penuaan, antiplatelet, mendetoksifikasi logam berat, fibrinolisis, hypolipidaemik (penurun lipid) dan penambah kekebalan tubuh (Mehta, 2013). Umbi bawang putih mengandung 4,50 g protein; 0,20 g lemak; 23,10 g karbohidrat; 42 mg kalsium; 134 mg fosfor; 1 mg besi; 0,22 mg vitamin B; 15 mg vitamin C; 71 g air dan 95 kalori (Sulichantini, 2016).

Keampuhan bawang tunggal sebagai herbal berkhasiat tinggi dibandingkan dengan bawang putih biasa yang bersiung banyak, selain ampuh menurunkan tekanan darah, bawang putih tunggal juga terbukti berkhasiat mengobati penyakit tuberkulosis. Senyawa aktif bawang putih tunggal adalah dialilsulfida. Senyawa tersebut bermanfaat menurunkan hipertensi, kolesterol, antidiabetes, meluruhkan lemak dalam darah dan mengencerkan darah. Kandungannya lebih tinggi dari bawang putih biasa, hal tersebut dibuktikan dari aroma bawang tunggal yang lebih menyengat (Utami dan Mardana, 2013).

2.2 Kultur jaringan

Menurut Yusnita (2003), kultur jaringan dalam bahasa asing disebut dengan tissue culture, weefsel cultuus atau gewebe kultur. Kultur adalah budidaya dan jaringan adalah sekelompok sel yang mempunyai bentuk dan fungsi yang sama. Jadi kultur jaringan tanaman yaitu teknik menumbuhkembangkan bagian tanaman, berupa sel, jaringan, atau organ dalam kondisi aseptik secara *in vitro*.

Perbanyakan tanaman secara kultur jaringan mempunyai kelebihan dibandingkan dengan perbanyakan tumbuhan secara konvensional yaitu dapat menghasilkan tanaman baru dalam jumlah yang banyak dan dalam waktu yang relatif singkat. Tanaman baru yang dihasilkan juga mempunyai sifat-sifat biologis yang sama dengan sifat induknya dan bersifat unggul. Sistem budidaya secara kultur jaringan ini juga memiliki keuntungan lain yaitu penghematan tenaga, waktu, tempat dan biaya (Zulkarnain, 2009)

Teknik kultur jaringan tanaman bermula dari pembuktian sifat totipotensi sel, bahwa setiap sel tumbuhan yang hidup dilengkapi dengan informasi genetik dan perangkat fisiologis yang lengkap untuk tumbuh dan berkembang menjadi tumbuhan utuh, jika kondisinya sesuai. Teknik kultur jaringan tumbuhan ini sangat potensial untuk program pemuliaan tanaman karena dapat memperbanyak tumbuhan tertentu yang sulit atau sangat lambat untuk diperbanyak secara konvensional, dibutuhkan dalam waktu relatif singkat sehingga lebih ekonomis (Yusnita, 2003). Beberapa faktor yang

mempengaruhi keberhasilan kultur jaringan adalah media tanam, zat pengatur tumbuh, sumber eksplan yang digunakan dan faktor lingkungan (Zulkarnain, 2009).

Media merupakan salah satu faktor penentu keberhasilan perbanyakan tumbuhan secara kultur jaringan. Media tanam dalam kultur jaringan adalah tempat untuk tumbuhnya eksplan. Berbagai komposisi media kultur telah diformulasikan untuk mengoptimalkan pertumbuhan dan perkembangan tumbuhan yang dikulturkan (Yusnita, 2003).

Zulkarnain 2009 menyatakan bahwa media tanam pada umumnya berisi semua zat yang diperlukan untuk menjamin pertumbuhan eksplan. Bahan-bahan yang diramu berisi campuran garam mineral sebagai sumber unsur makro dan unsur mikro, gula, vitamin, dan hormon tumbuh. Beberapa macam media dasar yang pada umumnya diberi nama sesuai dengan nama penemunya, antara lain adalah:

1. Medium dasar Murashige dan Skoog (MS): digunakan untuk hampir semua jenis tumbuhan, terutama tumbuhan herbaceus. Media ini mempunyai konsentrasi garam-garam mineral yang tinggi dan senyawa N dalam bentuk NO_3^- dan NH_4^+
2. Medium dasar B5 atau Gamborg: digunakan untuk kultur suspensi sel kedelai, alfafa dan legume lainnya.
3. Medium dasar White: digunakan untuk kultur akar. Medium dasar dengan konsentrasi garam-garam mineral yang rendah
4. Medium Vacient Went (VW): digunakan khusus untuk medium anggrek
5. Medium Knudson (Kc): digunakan khusus untuk medium anggrek
6. Medium dasar Nitsch: untuk kultur tepungsari (pollen) dan kultur sel
7. Medium dasar Schenk dan Hildebrandt: untuk kultur tumbuhan monokotil
8. Medium dasar Woody Plant Medium (WPM): untuk tumbuhan berkayu
9. Medium dasar N6: digunakan untuk tumbuhan serealia terutama padi

Zpt merupakan senyawa organik bukan hara yang dalam konsentrasi rendah dapat memacu pertumbuhan dan dalam konsentrasi tinggi dapat menghambat atau mengganggu proses fisiologis tumbuhan. Didalam tubuh tumbuhan senyawa organik ini jumlahnya sangat sedikit, maka diperlukan penambahan hormon dari luar. Hormon sintesis yang ditambahkan dari luar tubuh tanaman disebut zat pengatur tumbuh. Zat ini fungsinya untuk merangsang pertumbuhan, misalnya pertumbuhan akar, tunas, perkecambahan dan sebagainya (Zulkarnain, 2009)

Zat pengatur tumbuh dibagi menjadi 5 kelompok yaitu auksin, sitokinin, giberelin, asam absisat dan etilen. Zat pengatur tumbuh yang termasuk auksin adalah Indol Asam Asetat (IAA), Indol Asam Butirat (IBA), Naftalen Asam Asetat (NAA) DAN 2,4-D. Zat pengatur tumbuh yang termasuk sitokinin adalah kinetin, zeatin, Ribosil dan Benzil Asam Amino Purin (BAP). Zat pengatur tumbuh yang termasuk giberelin antara lain adalah GA1, GA2, GA3 dan GA4. (Supadno, 2001).

2.3 Kultur kalus

Kultur kalus adalah membiakkan sekelompok sel yang berasal dari jaringan tanaman yang tumbuh dalam medium hara. Medium tersebut terbuat dari garam anorganik, sumber karbon (biasanya sukrosa), auksin dan sitokinin. Komposisi medium merupakan hal yang penting bagi masing-masing spesies yang dibiakkan. Untuk menghasilkan kalus yang baik, zat hara berperan merangsang pertumbuhan sel dengan cepat. Beberapa jaringan tanaman dapat digunakan untuk membentuk biakan kalus seperti akar, batang, daun, meristem dan anther. Namun demikian, untuk spesies-spesies

tertentu dari salah satu jenis kalusnya dapat menghasilkan kalus yang lebih baik dari yang lainnya (Suryowinoto, 1996).

Kultur yang lebih berpotensi untuk digunakan dalam produksi metabolit sekunder adalah kultur suspensi sel dan kultur kalus. Kultur kalus adalah massa sel yang tidak terdiferensiasi, terdiri dari sel parenkim yang muncul dari sel jaringan induk yang sedang membelah dan biasanya terjadi di tempat irisan untuk menutupi luka dalam media (George and Sherrington, 1984). Pengembangbiakan massal melalui kultur jaringan tak mempengaruhi kandungan senyawa aktif sebuah tanaman. Syaratnya dalam budidaya harus dikondisikan (suhu, iklim, intensitas cahaya, nutrisi) seperti habitat aslinya (Subroto dan Saputro, 2008).

2.4 Metabolit sekunder

Metabolit sekunder adalah senyawa metabolit yang tidak esensial bagi pertumbuhan organisme dan ditemukan dalam bentuk yang unik atau berbeda antar spesies satu dan lainnya. Setiap organisme biasanya menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang berbeda-beda, bahkan mungkin satu jenis senyawa metabolit sekunder hanya ditemukan pada satu spesies dalam satu kingdom. Senyawa ini juga tidak selalu dihasilkan, tetapi hanya pada saat dibutuhkan saja atau pada fase-fase tertentu (Harborne, 1987).

Sebagian besar tumbuhan penghasil senyawa metabolit sekunder memanfaatkan senyawa tersebut untuk mempertahankan diri dan berkompetisi dengan makhluk hidup lain di sekitarnya. Tumbuhan dapat menghasilkan metabolit sekunder (seperti: quinon, flavonoid, tanin, dll). Hal ini disebut sebagai alelopati. Berbagai senyawa metabolit sekunder telah digunakan sebagai obat atau model untuk membuat obat baru, contohnya adalah aspirin yang dibuat berdasarkan asam salisilat yang secara alami terdapat pada tumbuhan tertentu. Manfaat lain dari metabolit sekunder adalah sebagai pestisida dan insektisida, contohnya adalah rotenon dan rotenoid. Beberapa metabolit sekunder lainnya yang telah digunakan dalam memproduksi sabun, parfum, minyak herbal, pewarna, permen karet dan plastik alami adalah resin, antosianin, tanin dan saponin (Zulkarnain, 2009).

Pighin (2003) menyatakan bahwa untuk mempelajari biosintesis dari metabolit sekunder tanaman dapat dilakukan dengan kultur suspensi sel. Hal tersebut disebabkan karena kemampuannya memproduksi senyawa yang berguna di bawah kondisi yang terkontrol sehingga teknik ini dapat digunakan untuk menghasilkan senyawa kimia yang sedang dibutuhkan oleh pasar. Selain itu ada sel-sel khusus yang dapat diperbanyak untuk menghasilkan senyawa metabolit tertentu yang tidak dapat diproduksi melalui perbanyakan tanaman secara konvensional.

Menurut (Tabata 1997) keuntungan produksi metabolit sekunder melalui kultur jaringan tumbuhan adalah sebagai berikut:

1. Melalui kultur jaringan tumbuhan dapat dibentuk senyawa yang bermanfaat dalam kondisi terkontrol dan dalam waktu yang relatif lebih singkat.
2. Sel-sel tumbuhan dapat diperbanyak dengan mudah untuk memperoleh senyawa metabolit tertentu.
3. Pertumbuhan sel secara otomatis terawasi dan proses metabolisme dapat diatur secara rasional.
4. Hasil produksi yang diperoleh lebih konsisten, baik dalam kualitas maupun kuantitas, karena kondisi lingkungannya dapat diatur.

5. Melalui kultur jaringan tumbuhan dapat dibentuk senyawa baru yang tidak terdapat dalam tanaman induknya dan senyawa baru ini mungkin berguna untuk dikembangkan atau dimanfaatkan lebih jauh.
6. Kultur tidak bergantung pada kondisi lingkungan seperti keadaan geografis, iklim, musim dan tidak memerlukan lahan yang luas.

Secara umum kandungan metabolit sekunder dalam bahan alam hayati dikelompokkan berdasarkan sifat dan reaksi yang khas suatu metabolit sekunder dengan pereaksi tertentu. Atas dasar ini kandungan metabolit sekunder dapat dikelompokkan seperti flavonoid, alkaloid, tanin, saponin dan triterpenoid.

Flavonoid merupakan golongan senyawa bahan alam dari senyawa fenolik yang banyak merupakan pigmen tumbuhan. Fungsi kebanyakan flavonoid dalam tubuh manusia adalah sebagai antioksidan, sehingga sangat baik untuk pencegahan kanker. Mekanisme kerja flavonoid lainnya adalah inaktivasi karsinogen, antiproliferasi, penghambatan siklus sel, induksi apoptosis, diferensiasi, inhibisi angiogenesis serta pembalikan resistensi, multi obat ataupun kombinasi dari mekanisme-mekanisme tersebut (Manoi, 2008).

Alkaloid merupakan golongan zat tumbuhan sekunder yang terbesar, sekitar 5.500 telah diketahui. Alkaloid sering kali beracun bagi manusia dan banyak mempunyai manfaat, jadi digunakan secara luas dalam bidang pengobatan. Alkaloid biasanya tanpa warna, kebanyakan berbentuk kristal tetapi hanya sedikit yang berupa cairan (misalnya nikotina) pada suhu kamar (Robinson, 1995). Hampir semua alkaloid memiliki keaktifan farmakologi tertentu, ada yang bersifat racun bagi manusia tetapi banyak juga yang digunakan dalam bidang pengobatan, seperti untuk menaikkan tekanan darah, mengurangi rasa sakit dan dapat melawan infeksi mikroba (Subroto dan Saputro, 2008).

Tanin merupakan astrigen dan polifenol tanaman berasa pahit yang dapat mengikat dan mengendapkan protein. Umumnya tanin digunakan untuk pengobatan misalnya untuk pengobatan diare, hemostatik dan wasir. Sementara khasiat polifenol adalah anti mikroba dan mampu menurunkan kadar gula darah (Manoi, 2008).

Saponin adalah glikosida triterpena dan sterol dan telah terdeteksi dalam lebih dari 90 suku tumbuhan. Saponin merupakan senyawa aktif permukaan dan bersifat seperti sabun serta dapat dideteksi berdasarkan kemampuannya membentuk busa dan menghemolisis sel darah (Harborne, 1987).

Senyawa terpen mudah dikenal dalam tanaman yang berbau harum dan disamping itu mudah sekali diisolasi dengan cara destilasi dari daun, batang dan bunga yang kemudian dikenal dengan nama minyak atsiri. Senyawa ini banyak digunakan untuk berbagai keperluan seperti sebagai pengharum makanan, parfum, obat-obatan dan sebagainya. Triterpen tertentu terkenal karena rasanya, terutama kepahitannya, contohnya limonin, suatu senyawa pahit yang larut dalam lemak dan terdapat dalam buah jeruk. Senyawa ini berfungsi sebagai pelindung dan penolak dari serangan serangga dan mikroba (Sastrohamidjojo, 1996).

2.5 Sintesis Sukrosa Menjadi Senyawa Metabolit Sekunder

Berdasarkan penelitian Irmawati (2007), konsentrasi sukrosa yang optimal dapat meningkatkan kandungan senyawa metabolit sekunder. Sukrosa dalam sel kalus akan terhidrolisis membentuk glukosa dan fruktosa. Sukrosa mempengaruhi pembentukan metabolit sekunder melalui jalur glikolisis dan siklus krebs. Bajaj (1988) menyatakan adanya metabolit sekunder dalam kalus disebabkan adanya kemampuan sel tanaman *in vitro* untuk mensintesis metabolit sekunder. Hal ini disebabkan adanya daya totipotensi biokimia yang terdapat didalam sel.

Dalam pembentukan metabolit sekunder, sukrosa berfungsi sebagai sumber energi, sumber karbon dan untuk mengatur sinyal yang mempengaruhi sel dalam pembentukan metabolit sekunder. Menurut Ramawat dan Merillon (1999), enzim heksokinase dan tumbuhan berfungsi sebagai sensor gula. Sukrosa yang tinggi akan mengaktifkan enzim heksokinase. Heksokinase akan mengaktifkan protein fosfatase dan protein kinase yang mengatur proses transkripsi protein sehingga terbentuk gen pengeksresi pembentukan metabolit sekunder.

Sukrosa dalam media masuk kedalam sel melalui proses difusi dan osmosis. Sukrosa masuk kedalam sel akan terhidrolisis menjadi glukosa dan fruktosa oleh enzim interfase. Proses hidrolisis sukrosa oleh enzim interfase berlangsung di sitosol, vakuola maupun dinding sel (Salisbury dan Ross, 1995). Tingginya kandungan sukrosa yang terdapat dalam tanaman mempengaruhi pembentukan metabolit sekunder melalui jalur glikolisis dan siklus krebs. Glukosa yang terbentuk selanjutnya akan masuk ke dalam jalur D-glukoronat dan L-gulonat untuk membentuk fenolik dan flavonoid (Manitto, 2002).

Beberapa penelitian tentang penambahan sukrosa untuk meningkatkan kandungan metabolit sekunder pada tanaman telah dilakukan pada beberapa penelitian diantaranya penelitian Nurchayati dan Afiah (2010) penambahan sukrosa 20g/L sudah menunjukkan adanya kandungan metabolit sekunder yaitu asam askorbat pada kalus *Hibiscus sabdarifa* l. Berdasarkan informasi tersebut maka diajukan penelitian mengenai pengaruh kadar sukrosa terhadap pertumbuhan kalus dan senyawa metabolit sekunder tanaman bawang putih tunggal (*A. sativum* L.).

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April sampai Oktober 2019 dan dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan Tumbuhan, Laboratorium Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Mulawarman, Samarinda, Kalimantan Timur.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Pembentukan kalus

Alat-alat yang digunakan adalah LAF (*laminar air flow cabinet*), *autoclave*, *incubator*, timbangan analitik, pH meter, *hot plate*, pipet tetes, pipet ukur, botol kultur, cawan petri, *beaker glass*, gelas ukur, spatula, *erlenmeyer*, karet gelang, *aluminium foil*, plastik (*cling wrap*), lampu spritus pinset, *scaple* dan mata pisau, corong, *magnetic stirrer*, *handsprayer*, tisu gulung, alat tulis, kamera dan kertas label.

Bahan tanaman yang digunakan adalah umbi bawang putih tunggal (*A. sativum*), larutan stok untuk media MS0, aquades, agar, gula, HCl 1 N, NaOH 1 N, bakterisida, fungisida, detergen, tween 20, bayclin 15%, bayclin 20%, alkohol 70%, alkohol 95%, zat pengatur tumbuh picloram.

3.2.2 Ekstraksi sampel

Alat-alat yang digunakan adalah neraca analitik, botol sampel, pinset, mortar, rotary evaporator, vacuum pump, tissue, gelas ukur, corong, kertas saring dan aluminium foil. Bahan yang digunakan antara lain: kalus bawang putih tunggal (*Allium sativum* L.) umur 3 bulan, alkohol 95%, vaselin, es batu dan aquadest.

3.2.3 Uji fitokimia

Alat yang digunakan untuk uji fitokimia yaitu: tabung reaksi, rak tabung, neraca analitik, pipet tetes, corong, cawan petri, kertas saring, batang pengaduk, hot plate, beaker glass, eppendorf, mikropipet, blue tip, yellow tip, kamera digital, kertas label, aluminium foil, tissue dan alat tulis. Sedangkan bahan-bahan yang digunakan yaitu: ekstrak kalus tanaman bawang putih tunggal (*Allium sativum* L.), etanol, HCL pekat larutan dragendroff, NaOH 1M, larutan FeCl 1%, dietil eter, serbuk Mg, kloroform-amoniak, asam asetat glacial, H₂SO₄ pekat, dimethyl sulfoxide, asam galat, catechin, NaNO₂ 5% dan AlCl₃ 10%.

3.3 Rancangan Penelitian

3.3.1 Pembentukan Kalus

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan perlakuan konsentrasi sukrosa 30, 60, 90 dan 120 gram. Setiap perlakuan diulang sebanyak 10 kali ulangan. Total unit percobaan adalah 40 unit.

3.4 Cara Kerja

3.4.1 Sterilisasi alat

Alat-alat yang digunakan untuk penanaman harus dalam keadaan steril. Alat-alat logam dan gelas ada yang disterilkan dalam autoclave, alat tersebut dibungkus dengan kertas kemudian disterilisasi pada suhu 121°C selama 30 menit dengan tekanan 15 lbs (Zulkarnain, 2009). Sterilisasi botol dilakukan setelah botol dicuci terlebih dahulu. Botol kultur steril selanjutnya disimpan pada tempat yang bersih dan siap digunakan. Alat-alat tanam seperti petri disk, pinset dan *scapel* dapat disterilkan kembali dengan alkohol 95% kemudian pemanasan di atas api bunsen.

3.4.2 Pembuatan Media Kultur

Komposisi penyusun media MS ditimbang dan dikelompokkan sesuai dengan stok masing-masing larutan stok makro, larutan stok mikro, larutan stok $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, larutan stok iron (Fe), larutan stok myo-inositol, larutan stok vitamin dan stok zat pengatur tumbuh Picloram. Kemudian dilarutkan dengan aquades steril dan dimasukkan ke dalam botol steril lalu disimpan dalam lemari pendingin sampai saat digunakan.

Erlenmeyer diisi dengan larutan stok makro, stok mikro, stok $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, stok iron (Fe), stok myo-inositol, stok vitamin, ZPT (Picloram 5ppm) dan sukrosa sesuai perlakuan, setelah itu dimasukkan gula, ditambahkan 800 mL aquades steril kedalamnya dan kemudian dihomogenkan dengan menggunakan magnetik stirer. Selanjutnya volume dicukupkan menjadi 1000 ml dan diatur pH-nya menjadi 5,6-5,8 dengan menggunakan kertas pH yaitu dengan cara menambahkan 0,1 N NaOH atau 0,1 N HCl beberapa tetes bila pH media belum mencapai ketentuan pH. Setelah pH diatur, lalu dimasukkan agar powder sebanyak 7,5 g kemudian dipanaskan sampai mendidih. Selanjutnya media tersebut dimasukkan ke dalam botol-botol kultur dan ditutup dengan menggunakan plastik pp dan diikat dengan karet gelang. Setelah itu disterilkan dengan menggunakan *autoclave* pada temperatur 121°C dan tekanan 15 psi (*Pound per Square Inch*) selama 15 menit. Media yang digunakan untuk penanaman disimpan di ruang kultur sebelum digunakan (Zulkarnain, 2009; Mehta, *et al.*, 2013; Harahap dan Nusyiwana, 2014).

3.4.3 Persiapan Penanaman

3.4.3.1 Sterilisasi Eksplan

Sterilisasi dilakukan melalui sterilisasi luar dan sterilisasi dalam. Tahapan sterilisasi luar: umbi bawang putih tunggal (*Allium sativum*) di sterilkan dengan cara mencuci umbi di air yang mengalir, kemudian cuci dengan deterjen selama 30 menit, kembali dicuci dengan air mengalir, rendam umbi dalam fungisida ditambahkan dengan tween 20 sebanyak 5 tetes selama 30 menit (Armila, 2014). Umbi dicuci pada air mengalir kemudian disteril di dalam laminar.

Tahapan sterilisasi dalam: sterilisasi bawang putih tunggal di dalam laminar dimulai dengan menggunakan alkohol 70% selama 1 menit, dibilas dengan aquades steril secukupnya dan dilanjutkan dengan pencucian di dalam bayclin 10% ditambah 3 tetes tween 20 selama 10 menit, dibilas kembali dengan aquades sebanyak 3 kali (Demeke, 2014). Umbi yang sudah di steril disimpan dalam cawan petri kemudian diberi larutan aseptik betadin, eksplan dipotong dan siap ditanam.

3.4.3.2 Penanaman Eksplan

Eksplan ditanam ke dalam botol yang berisi media perlakuan. Penanaman eksplan dalam media induksi kalus menggunakan bagian bulbi pada tanaman bawang putih tunggal. Botol yang telah berisi eksplan tersebut ditutup dengan menggunakan plastik PP, kemudian diikat dengan karet gelang dan diinkubasi dalam ruang steril dengan suhu ruangan 25°C selama 12 MST.

3.4.3.3 Subkultur Kalus

Kalus yang diperoleh disubkultur pada media yang sama yang akan dijadikan sebagai bahan untuk uji metabolit sekunder.

3.5 Pembuatan Ekstrak

Kalus yang diperoleh kemudian dimaserasi dengan campuran etanol menggunakan mortar. Setelah didapat hasil maserasi kemudian dilanjutkan dengan proses evaporasi. Setelah itu dapat dilanjutkan dengan uji fitokimia (Gangga dkk., 2007).

3.6 Uji Fitokimia

3.6.1 Uji kualitatif

Uji metabolit sekunder secara kualitatif dilakukan untuk melihat senyawa metabolit sekunder yang terkandung pada kalus bawang putih tunggal dari konsentrasi sukrosa 30, 60, 90, dan 120 g/L.

a. Uji Alkaloid (Uji dragendorff)

Ekstrak cair kalus dipipet sebanyak 1 mL lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 3 tetes kloroform-amoniak 0,005 M dan dihomogenkan. Kemudian disaring kedalam tabung yang berbeda dan didapatkan berupa residu dan filtrat. Pada tabung reaksi yang berisi filtrat ditambahkan 3 tetes asam sulfat (H_2SO_4) 2 M dan dikocok hingga terbentuk 2 fase asam dan basa. Kemudian diambil bagian asam (terdapat pada lapisan atas) lalu ditambahkan 3 tetes Dragendorf (campuran $Bi(NO_3)_{2.5}H_2O$ dalam asam nitrat dan larutan KI). Terbentuknya endapan warna merah coklat menandakan bahwa larutan ekstrak kalus positif mengandung alkaloid (Wachidah, 2013).

b. Uji Flavonoid

Ekstrak cair kalus dipipet sebanyak 1 mL lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 10 mL air panas dan dididihkan selama ± 5 menit. Kemudian disaring kedalam tabung yang berbeda dan didapatkan berupa residu dan filtrat. Pada tabung reaksi yang berisi filtrat ditambahkan 0,05 mg serbuk Mg dan 1 mL HCl pekat lalu dikocok hingga homogen. Warna merah, kuning atau jingga yang terbentuk menandakan ekstrak kalus positif mengandung flavanoid (Wachidah, 2013).

c. Uji Fenolik

Ekstrak cair kalus dipipet sebanyak 1 mL lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 3 tetes $FeCl_3$ 1% dan dihomogenkan. Warna hijau, merah, ungu, biru atau hitam pekat yang terbentuk menandakan bahwa larutan ekstrak kalus positif mengandung fenolik (Wachidah, 2013).

d. Uji Saponin/ Uji Froth

Ekstrak cair kalus dipipet sebanyak 1 mL lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 3 tetes dietil eter dan dihomogenkan. Fraksi yang tidak larut dietil eter ditambahkan 5 mL air panas lalu dikocok kuat-kuat selama ± 10 detik. Apabila terbentuk busa pada larutan kalus yang diuji selama ± 10 menit dan jika ditambahkan 1 tetes HCl 2 N busa tersebut tidak hilang menandakan ekstrak kalus positif mengandung saponin (Wachidah, 2013).

e. Uji Steroid-Triterpenoid/ Uji Libermen_Buchard

Ekstrak cair kalus dipipet sebanyak 1 mL lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 3 tetes dietil eter dan di homogenkan. Fraksi yang larut dietil eter ditambahkan 3 tetes asam asetat glasial dan 3 tetes H_2SO_4 pekat lalu dihomogenkan. Terbentuknya warna merah atau ungu menandakan larutan ekstrak kalus positif mengandung triterpenoid (Wachidah, 2013).

3.6.2 Uji Aktivitas Antioksidan

a. Pembuatan Larutan DPPH

Kristal DPPH ditimbang sebanyak 2,4 mg dan dilarutkan dengan 100 mL etanol dihomogenkan. Kemudian ditempatkan dalam labu ukur gelap sehingga didapatkan

larutan DPPH dengan konsentrasi 0,024 mg mL⁻¹ yang digunakan pada pengujian. Larutan disimpan pada tempat gelap.

b. Penentuan Panjang Gelombang Optimum

Larutan DPPH 0,024 mg mL⁻¹ dipipet 1 mL dan ditambahkan 1 mL etanol. Setelah dibiarkan selama 30 menit di tempat gelap serapan larutan diukur dengan Spektrofotometer pada panjang gelombang 200-600 nm untuk mendapatkan panjang gelombang optimum.

c. Pembuatan Ekstraksi Sampel

Ekstrak kalus bawang putih tunggal ditimbang 5 mg, kemudian dilarutkan dalam 10 mL etanol, larutan ini merupakan larutan induk. Sebanyak 20 µL, 40, 100, 200, dan 400 larutan induk dipipet sebanyak 3 kali ulangan dan dimasukkan kedalam tabung reaksi untuk mendapatkan konsentrasi sampel 5, 10, 25, 50 dan 100. Masing-masing tabung ditambahkan 1 mL larutan DPPH dan ditambahkan etanol sampai mencukupi 2 mL kemudian dihomogenkan.

d. Pembuatan Larutan Perbandingan

Ditimbang 10 mg vitamin C, lalu dilarutkan dalam 10 mL etanol (1) larutan ini merupakan larutan induk. 1 mL larutan induk vitamin C diambil dan dilarutkan dalam 10 mL etanol (0,1). Sebanyak 20, 40, 100, 200, 400 larutan induk dipipet sebanyak 3 kali ulangan dan dimasukkan dalam tabung reaksi untuk mendapatkan konsentrasi sampel 1, 1,5, 2, 2,5 dan 3. Masing-masing tabung ditambahkan 1 mL etanol sampai mencukupi 2 mL kemudian dihomogenkan.

e. Pengukuran Serapan Perendaman Radikal Bebas DPPH

Larutan uji dan perbandingan dengan beberapa konsentrasi diinkubasi selama 30 menit di tempat gelap. Serapan lalu diukur menggunakan spektrofotometer UV-vis.

Presentase hambatan dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ Hambatan} = \frac{\text{Absorbansi DPPH} - \text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi DPPH}}$$

(Bouftira *et al*, 2012)

3.7 Parameter Pengamatan

Parameter uji kualitatif kalus yang diperoleh pada akhir pengamatan (12 MST) meliputi morfologi kalus (warna dan tekstur kalus) dan metabolit sekunder yang diamati adalah ada tidaknya kandungan alkaloid, flavonoid, fenolik, saponin, triterpenoid, steroid dan tanin ditandai dengan tanda (+) jika ada dan tanda (-) jika tidak ada.

Parameter uji kuantitatif meliputi pertambahan bobot kalus. Untuk metabolit sekunder berupa uji aktifitas antioksidan.

3.8 Analisis data

Data yang diperoleh dianalisis secara kualitatif dengan menggunakan metode deskripsi dan pertumbuhan kalus menggunakan SPSS v.22 dengan uji ANOVA serta uji

metabolit sekunder dianalisis dengan menggunakan persamaan regresi linier berdasarkan perhitungan untuk aktifitas antioksidan.

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Morfologi Kalus

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah kalus yang berasal dari embrio tanaman bawang putih tunggal (*Allium sativum* L.) yang ditanam dalam media MS dengan penambahan zat pengatur tumbuh Picloram 5 ppm dan variasi konsentrasi sukrosa sebesar (30, 60, 90 dan 120 g/L). Setelah dilakukan pengamatan selama 12 MST (Minggu Setelah Tanam) pada media perlakuan didapatkan hasil seperti yang terlihat pada tabel 4.1

Tabel 4.1. Morfologi dan pertambahan berat kalus bawang putih tunggal (*Allium sativum* L.) pada media MS yang diberi zat pengatur tumbuh Picloram serta variasi konsentrasi sukrosa setelah 12 MST (Minggu Setelah Tanam)

Media Perlakuan Sukrosa	Morfologi kalus		Pertambahan berat kalus
	Warna	Tekstur	
30 gr	Putih	Remah	2,84 ^a gr
60 gr	Putih	Remah	3,44 ^b gr
90 gr	Putih kekuningan	Remah	5,29 ^d gr
120 gr	Putih kekuningan	Remah	4,19 ^c gr

Keterangan: angka yang diikuti huruf yang berbeda menandakan ada beda nyata dengan menggunakan uji Kruskal Wallis dan dilanjutkan uji Man Withney dengan taraf kepercayaan 95%

Kalus muncul pertama kali pada bagian eksplan yang terluka, yaitu pada bagian bekas irisan, dan kemudian menyebar pada permukaan eksplan. Munculnya kalus merupakan respon awal sel terhadap zpt yang diberikan pada media. Menurut Bustami (2011), yang telah melakukan penelitian tentang kacang tanah, adanya pelukaan pada daun dapat memudahkan zpt untuk berdifusi ke dalam jaringan tanaman. Zpt berdifusi ke dalam jaringan tanaman, terutama melalui jaringan yang terluka, akan menstimulasi pembelahan sel terutama sel-sel yang berada di sekitar daerah yang terluka. Inisiasi kalus ditandai dengan munculnya gumpalan sel-sel yang berwarna putih. Selanjutnya gumpalan tersebut berkembang membentuk massa sel yang disebut kalus.

Berdasarkan hasil pada Tabel 4.1 dapat diketahui bahwa semua eksplan yang ditanam pada media perlakuan dapat membentuk kalus. Kalus terbentuk mulai dari minggu ke 3 setelah tanam. Tanaman bawang putih tunggal memiliki kemampuan yang baik dalam membentuk kalus pada media perlakuan. Penambahan zpt picloram dan sukrosa dalam media memberikan respon terbentuknya kalus. Tan dkk., (2010) menyatakan bahwa picloram merupakan zat pengatur tumbuh terbaik dari golongan auksin yang dapat membentuk kalus dibandingkan jenis auksin lainnya.

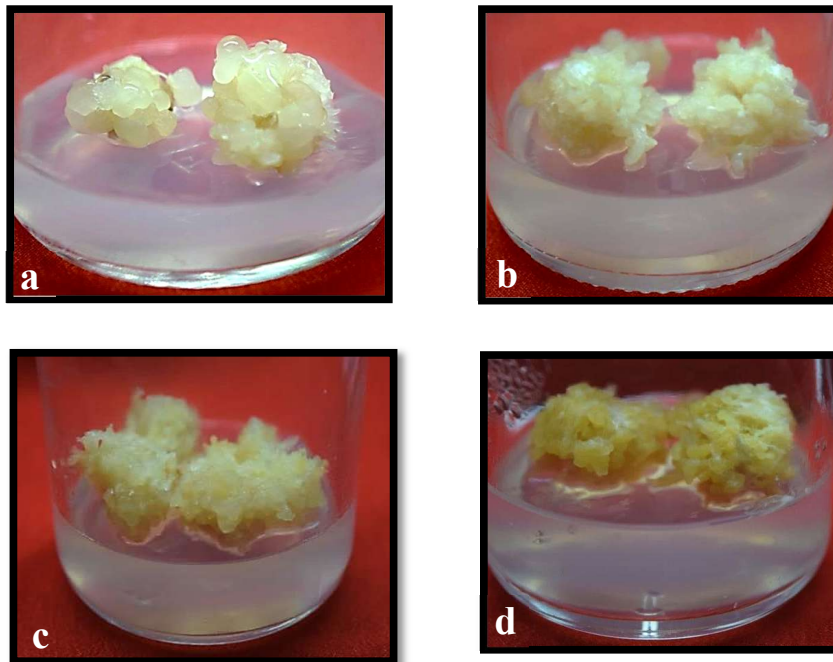
Selain penambahan zat pengatur tumbuh, penambahan sukrosa juga dapat merangsang pembentukan kalus. Penambahan sukrosa ke dalam media berperan sebagai prekursor yang merupakan sumber karbon yang berfungsi sebagai sumber energi yang dibutuhkan untuk pertumbuhan sel. Pada penelitian Kaisar (2014) penambahan sukrosa dengan konsentrasi 90 gr/L menghasilkan kalus terbaik pada tanaman bawang putih tunggal. Pada penelitian Sari dkk., (2016) penambahan sukrosa dengan konsentrasi 30 gr/L terbaik untuk menginduksi kalus pada tanaman sarang semut (*Myrmecodia tuberosa* Jack).

Kalus bawang putih yang terbentuk memiliki tekstur yang remah. Kalus yang terbentuk dalam kultur jaringan terbagi menjadi 2 yaitu kalus bertekstur remah dan kompak. Menurut Fatimah *et al.*, (2010) kalus dengan struktur remah merupakan kalus yang terbentuk dari sekumpulan sel yang mudah lepas. Struktur kalus remah sangat berkorelasi dengan kecepatan daya tumbuh kalus sehingga produksi metabolit sekunder tertentu yang ingin diperoleh lebih cepat. Kalus yang bertekstur kompak adalah kalus yang terdiri dari sekumpulan sel yang kuat dan sulit dipisahkan.


Penelitian Kiong dkk., (2007) picloram dengan konsentrasi 1 mg/L, 3 mg/L dan 5 mg/L menghasilkan kalus yang bertekstur remah pada tanaman *Melalauca alternifolia*. Kalus kompak dan remah dapat dijadikan sebagai bahan metabolit sekunder karena dapat mengakumulasi metabolit sekunder dengan baik (Indah dan Ermavitalini, 2013; Sari dan Kusuma, 2016).

Hasil pengamatan terhadap warna kalus menunjukkan bahwa kalus yang terbentuk berwarna putih hingga putih kekuningan. Menurut Haryati dkk., (2017) perbedaan yang terjadi pada warna kalus dapat menunjukkan bahwa tingkat pertumbuhan kalus disetiap perlakuan berbeda-beda pula.

Pada Tabel 4.1 pada media perlakuan picloram 5 ppm + sukrosa 30 gr dan picloram 5 ppm + sukrosa 60 gr, menghasilkan kalus berwarna putih dan perlakuan picloram 5 ppm + sukrosa 90 gr dan picloram 5 ppm + sukrosa 120 gr kalus yang dihasilkan berwarna putih kekuningan. Kalus yang terbentuk pada perlakuan pada awalnya berwarna putih, setelah beberapa minggu mengalami perubahan warna menjadi putih kekuningan. Menurut Kaisar (2014) penambahan sukrosa dengan konsentrasi 90 gr/L pada tanaman bawang putih tunggal menghasilkan kalus dengan warna putih bening. Perubahan warna kalus yang terjadi pada perlakuan tersebut menunjukkan bahwa adanya perubahan dalam fase pertumbuhan sel. Warna kuning pada kalus menunjukkan adanya sel dewasa menuju fase pembelahan aktif (Armila dkk., 2014).



Gambar 4.2 Morfologi kalus pada tanaman bawang putih tunggal (*Allium sativum* L.) dengan perlakuan pemberian picloram 5 ppm ditambah sukrosa a). 30 gr; b). 60 gr; c). 90 gr; d). 120 gr

Keterangan:  = putih  = putih kekuningan

Selain zat pengatur tumbuh, sukrosa juga berpengaruh terhadap pertumbuhan kalus, sukrosa berperan sebagai sumber karbon untuk melakukan respirasi pada sel kalus tersebut, sehingga dapat mempercepat pertumbuhan kalus. Rata-rata pertambahan berat basah kalus tertinggi terdapat pada perlakuan dengan penambahan sukrosa 90 gr dengan pertambahan berat sebesar 5,29 gram. Pertambahan berat basah kalus yang terendah terdapat pada perlakuan dengan penambahan konsentrasi sukrosa 30 gr dengan pertambahan berat sebesar 2,84 gram. Hal ini diduga bahwa kombinasi zpt picloram dan penambahan sukrosa sebesar 90 gram pada media merupakan kombinasi yang optimum untuk menginduksi kalus pada tanaman bawang putih tunggal.

Pada penelitian Andre dkk., (2015) zat pengatur tumbuh picloram + kinetin dan penambahan sukrosa sebesar 3% dapat menginduksi kalus pada tanaman *Lippia multiflora* Moldenke dengan rata-rata berat kalus 80,10 gr. Menurut Irmawati (2007) menyatakan sukrosa berperan dalam pemanjangan dan pembelahan sel. Sukrosa yang terhirolisis menjadi glukosa dan fruktosa oleh enzim intervase menyebabkan terjadinya peningkatan tekanan turgor. Hal inilah yang diduga menyebabkan perbedaan peningkatan berat basah kalus, sebab respon setiap sel (berupa tekanan turgor) terhadap kondisi cairan disekitar sel berbeda-beda. Menurut Nurchayati (2010) konsentrasi

sukrosa yang tinggi diserap oleh sel-sel kalus selain digunakan untuk pertumbuhan juga digunakan untuk membentuk metabolit sekunder. Seiring dengan peningkatan konsentrasi sukrosa yang ditambahkan dalam medium ternyata menunjukkan peningkatan kandungan metabolit sekunder pada tanaman.

Peranan zat pengatur tumbuh dan sukrosa dalam pembentukan dan peningkatan berat kalus sangat diperlukan. Berat kalus erat kaitannya dengan pembelahan sel, kecepatan sel dalam membelah, serta kandungan air yang terdapat dalam sel. Adanya proses tersebut menyebabkan jumlah dan ukuran sel bertambah sehingga berat kalus yang dihasilkan berbeda pula sesuai dengan jumlah dan konsentrasi zat pengatur tumbuh dan sukrosa yang ditambahkan ke dalam media.

4.3 Uji Metabolit Sekunder Kalus Bawang Putih Tunggal (*Allium sativum* L.)

4.3.1 Uji Fitokimia

Hasil uji fitokimia secara kualitatif yang telah dilakukan terhadap ekstrak kalus embrio tanaman bawang putih tunggal (*Allium sativum* L.), menunjukkan bahwa ekstrak kalus tersebut mengandung metabolit sekunder. Senyawa metabolit sekunder yang terkandung di dalam ekstrak tersebut dapat dilihat pada Tabel 4.3.

Tabel 4.3 Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Kalus Tanaman Bawang Putih Tunggal (*Allium sativum* L.)

Perlakuan sukrosa	Jenis Senyawa				
	Alkaloid	Fenolik	Flavonoid	Triterpenoid	Saponin
30 gr	+	-	-	+	+
60 gr	+	-	-	+	+
90 gr	+	+	-	+	+
120 gr	+	+	-	+	+

Keterangan: (+) = terdeteksi senyawa metabolit sekunder; (-) tidak terdeteksi senyawa metabolit sekunder

Dari Tabel 4.3 dapat dilihat bahwa kombinasi zat pengatur tumbuh auksin berupa picloram dan penambahan sukrosa bisa berpengaruh terhadap kandungan metabolit sekunder yang dimilikinya. Pada perlakuan sukrosa 30 dan 60 gr, kalus positif mengandung alkaloid, triterpenoid dan saponin sedangkan pada perlakuan sukrosa 90 dan 120 gr, kalus positif mengandung alkaloid, fenolik, triterpenoid dan saponin. Pada perlakuan sukrosa 30 dan 60 gr tidak ditemukan adanya senyawa fenolik, hal ini diduga karena pada perlakuan 30 dan 60 gr konsentrasi sukrosa yang diberikan belum optimum untuk menghasilkan senyawa fenolik. Perbedaan kandungan metabolit sekunder yang terdapat pada kalus dapat disebabkan oleh penambahan zat pengatur tumbuh tertentu dan sukrosa. Menurut Nurchayati (2010) penambahan sukrosa yang tinggi juga dapat meningkatkan metabolit sekunder berupa asam askorbat dari kalus *Hibiscus sabdariffa* L dimana diperoleh dari perlakuan terbaik konsentrasi sukrosa 50 g/L sebanyak 0,41mg/g.

Uji alkaloid dinyatakan positif jika reaksi yang terjadi menghasilkan endapan berwarna jingga hingga merah kecoklatan maka ekstrak tersebut positif mengandung alkaloid. Manfaat alkaloid dalam bidang kesehatan antara lain adalah untuk memacu sistem syaraf, menaikkan atau menurunkan tekanan darah, dan melawan infeksi mikroba (Widi dan indarti, 2007).

Uji fenolik dinyatakan positif jika reaksi yang terjadi menghasilkan endapan berwarna merah, hijau, ungu, biru atau hitam maka ekstrak tersebut positif mengandung fenolik. Senyawa fenol berperan untuk transport elektron pada fotosintesis, mempunyai aktifitas anti inflamasi, memiliki aktivitas antioksidan sehingga menguntungkan bagi pengidap penyakit jantung koroner dan kanker.

Uji flavonoid dinyatakan positif jika reaksi yang terjadi menghasilkan warna merah, ungu atau jingga maka ekstrak tersebut positif mengandung flavonoid. Flavonoid bermanfaat untuk melindungi struktur sel, meningkatkan efektivitas vitamin C, anti inflamasi, mencegah keropos tulang, sebagai antibiotik, anti mikroba, anti virus, pengobatan asma, katarak dan diabetes (Haris, 2011; Subroto dan Saputro, 2008). Flavonoid termasuk senyawa fenolik alam yang potensial sebagai antioksidan dan mempunyai bioaktivitas sebagai obat. Senyawa-senyawa ini dapat ditemukan pada batang, daun, bunga, dan buah. Flavonoid dalam tubuh manusia berfungsi sebagai antioksidan sehingga sangat baik untuk pencegahan kanker (Waji dan Sugrani, 2009).

Uji triterpenoid dinyatakan positif jika reaksi yang terjadi menghasilkan endapan berwarna merah atau ungu maka ekstrak tersebut positif mengandung triterpenoid. Senyawa triterpenoid/steroid merupakan salah satu kandungan metabolit sekunder yang banyak digunakan sebagai obat antara lain untuk mengobati gangguan kulit, diabetes, gangguan menstruasi, malaria, dan anti inflamasi (Aldhani, 2014).

Uji saponin dinyatakan positif ditandai dengan terbentuknya busa setinggi 1-3 cm yang bertahan selama kurang lebih 15 menit. Saponin merupakan senyawa aktif permukaan dan bersifat seperti sabun serta dapat dideteksi berdasarkan kemampuannya dalam membentuk busa dan menghemolisis darah. Manfaat saponin antara lain melawan kolesterol di usus besar sebelum terserap kedalam aliran darah, dan sebagai pembersih sekaligus antiseptik (Aldhani, 2014).

4.3.2 Aktifitas Antioksidan Kalus Bawang Putih Tunggal (*Allium sativum* L.)

Hasil uji aktifitas antioksidan yang telah dilakukan dari dua ekstrak kalus bawang putih tunggal menunjukkan bahwa ekstrak kalus bawang putih tunggal memiliki aktifitas antioksidan, dapat dilihat pada tabel sebagai berikut:

Tabel 4.4 Hasil Uji Aktifitas Antioksidan Ekstrak Kalus Tanaman Bawang Putih Tunggal (*Allium sativum* L.)

Sampel	Konsentrasi ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Rata-rata Absorbansi (nm)	Rerata Inhibisi (%)	IC ₅₀ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
sukrosa 90 gr	5	0,275	1,43 %	33,78
	10	0,272	2,50 %	
	25	0,250	10,39 %	
	50	0,246	11,82 %	
	100	0,240	13,97 %	
	5	0,255	8,60 %	41,46
	10	0,276	1,07 %	

Sampel	Konsentrasi ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Rata-rata Absorbansi (nm)	Rerata Inhibisi (%)	IC ₅₀ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
sukrosa 120 gr	25	0,256	8,24 %	
	50	0,241	13,62 %	
	100	0,206	26,16 %	
Vitamin C	1	0,023	91,79 %	49,14
	1,5	0,012	95,69 %	
	2	0,012	95,69 %	
	2,5	0,010	96,41 %	
	3	0,011	96,05 %	

Berdasarkan hasil pengukuran aktivitas antioksidan ekstrak kalus bawang putih tunggal dengan pelarut etanol 95% yang direaksikan dengan larutan DPPH mengalami perubahan warna dari ungu menjadi lebih pucat. Perubahan warna tersebut mempengaruhi nilai absorbansi DPPH. Seperti yang terlihat pada Tabel 4.4, semakin tinggi konsentrasi sampel ekstrak kalus bawang putih tunggal yang digunakan maka akan semakin tinggi pula nilai inhibisi yang dihasilkan dan semakin rendah nilai absorbansi dari larutan DPPH. Terjadinya perubahan warna dikarenakan adanya senyawa yang memberikan atom hidrogen kepada radikal DPPH sehingga tereduksi menjadi bentuk yang lebih stabil yaitu DPPH-H (2,2-difenil-1-pikrilhidrazin) (Molyneux, 2004).

Metode yang digunakan untuk mengetahui aktifitas antioksidan adalah *inhibition concentration* (IC₅₀). Penentuan nilai IC₅₀ dilakukan untuk menentukan aktifitas ekstrak dalam menangkal radikal bebas sebesar 50% (Molyneux, 2004). Nilai antioksidan dapat dilihat dari nilai IC₅₀ yang diperoleh.

Dari Tabel 4.4 dapat diketahui bahwa nilai IC₅₀ perlakuan penambahan sukrosa 90 gr/L yaitu 33,78 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dan 120 gr/L yaitu 41,46 $\mu\text{g mL}^{-1}$ lebih besar dibandingkan dengan larutan standar (vitamin C). Menurut Sadeli (2016) semakin kecil nilai IC₅₀ maka semakin aktif ekstrak atau fraksi uji tersebut sebagai senyawa penangkal radikal bebas atau senyawa antioksidan. Molyneux (2004) menyatakan bahwa semakin kecil nilai IC₅₀ maka akan semakin tinggi aktifitas antioksidan. Secara spesifik senyawa dikatakan sebagai antioksidan sangat kuat jika nilai IC₅₀ <50 ppm, kuat untuk IC₅₀ bernilai 50-100 ppm, sedang jika bernilai 100-150 ppm, dan lemah jika nilai IC₅₀ bernilai 151-200 ppm. Dari pernyataan tersebut dapat diketahui bahwa ekstrak kalus bawang putih tunggal baik pada perlakuan 90 dan 120 gr/L sukrosa dengan nilai IC₅₀ <50 ppm memiliki aktivitas antioksidan yang sangat kuat.

Antioksidan merupakan zat yang dapat melawan pengaruh bahaya dari radikal bebas atau *Reactive Oxygen Spesies* (ROS) yang terbentuk sebagai hasil dari metabolisme oksidatif yaitu hasil dari reaksi-reaksi kimia proses metabolik yang terjadi dalam tubuh (Goldberg, 2003).

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Dari penelitian yang telah dilakukan dapat diketahui bahwa konsentrasi sukrosa 90 g/L merupakan konsentrasi terbaik dalam menginduksi kalus bawang putih tunggal (*Allium sativum* L.) dengan berat basah kalus sebesar yaitu 5,29 gr dengan morfologi kalus remah berwarna putih kekuningan dan menghasilkan kandungan metabolit sekunder terbaik dilihat dari aktifitas antioksidan tertinggi dengan nilai IC₅₀ sebesar 33,78 µg mL⁻¹

5.2 Saran

Diharapkan akan ada penelitian lanjutan dalam pengembangan senyawa metabolit sekunder dan ekstraksi senyawa murni pada kalus tanaman bawang putih tunggal (*Allium sativum* L.) secara *in vitro* sebagai bahan baku obat alami pengganti bahan yang diperoleh dari alam.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, B. 2011. *Prinsip Dasar Teknik Kultur Jaringan*. Alfabeta, Bandung.
- Aldhani, E. 2014. Penapisan Kandungan Fitokimia Pada Buah Labu Kuning (*Curcubita moschata*). *Jurnal Teknologi & Industri* 3 (1): 11-16.
- Alfian, B., dan Susanti R., 2012 *Analisis Senyawa Fenolik*, 43-65, Universitas Diponegoro Press, Semarang.
- Andre, S. B., K. Mongomake., K. K. Modeste., K. K. Edmond., K. Tchoa., K. T. Hilaire dan K. Y. Justin. 2015. Effects of plant growth regulators and carbohydrate on callus induction and proliferation from leaf explant of *Lippia multiflora* Moldenke (Verbenaceae). *International Journal of Agriculture and Crop Science*. 8 (2):118-127.
- Armila, N. K. P., M. U. Bustami dan Z. Basri. 2014. Sterilisasi Dan Induksi Kalus Bawang Merah (*Allium Ascalonicum* L.) Lokal Palu Secara *In Vitro*. *e-J. Agrotekbis* 2 (2) : 129-137.
- Bharat, P. 2014. Comparative Analytical Study Of Singel Buld Garlic and Multi Buld Garlic (*Allium sativum* Limm.) *International Journal Of Ayurveda and Alternative Medicine* 2 (4). Research Article. Unniversity Jamnagar, India.
- Bustami, M. U. 2011. Penggunaan 2,4-D untuk Induksi Kalus Kacang Tanah. *Media Litbang Sulteng* IV (2): 137-141.
- Demeke, Y., W. Tefera., N. Dechassa dan B. Abebie. 2014. Effect of plant growth regulators on in vitro cultured nodul explants of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) clones. *African Journal of Biotechnology*. 13 (28).
- Gaba, V.P. 2005. Plant Growth Regulator. In R.N. Trigiano and D.J. Gray (eds.) *Plant Tissue Culture and Development*. CRC Press. London. p. 87-100.
- Gangga, E., H. Asriani, dan L. Novita. 2007. Analisis Pendahuluan Metabolit Sekunder dari Kalus Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* [Scheff.] Boerl.). *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia* 1(5):17-22.
- George, E. F. and P. D. Sherrington. 1984. *Plant Propagation by Tissue Culture (Handbook and Directory of Commercial Laboratories)*. Eastern Press. England.
- Goldberg, G. 2003. *Plants: Diet and Health*. I Owa State Press, Blackwell Publishing Company, 2121 State Avenue, Ames, USA.
- Harborne, J. B. 1987. *Metode Fitokimia (Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan)*. (diterjemahkan oleh Kosasih P. dan Iwang S.). ITB. Bandung.
- Haryati, Muslimin dan I. N. Suwastika. 2017. Induksi Kalus Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L.) Pada Media Ms dengan Penambahan Berbagai Konsentrasi BAP (*Benzyl Amino Purine*) dan 2,4-D (*dichlorophenoxyacetic acid*). *Biocelebes*. 11(1):46-60
- Heriyanto, N. M. 2006. Keanekaragaman Jenis Pohon Yang Berpotensi Obat Di Taman Nasional Meru Betiri, Jawa Timur. *Penelitian Hutan dan Konservasi Alam*. Vol III, No.1. 55 – 64.

- Indah, P. N. Dan D. Ermavitalini. 2013. Induksi Kalus Daun Nyamplung (*Callophylum inophllum* Linn.) Beberapa Kombinasi Konsentrasi 6-Benzylaminopurine (BAP) dan 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). *Jurnal Sains Dan Seni Pomits*. 2(1), 2337-3520.
- Irmawati. 2007. *Pertumbuhan dan Kandungan Reseprin Kultur Kalus Rauwolfia verticillata (Lour). Baillon Pada Variasi Konsentrasi Sukrosa dalam Media MS*. Jurnal FMIPA Universitas Sebelas Maret. Surakarta.
- Iqbal, M. M., F. Nazir, J. Iqbal, S. Tehri dan Y. Zafar. 2011. *In Vitro* Micropropagation of Peanut (*Arachis hypogaea*) Through Direct Somatis Embryogenesis and Callus Culture. *International Journal of Agriculture & Biology*. 13: 811-814.
- Kinho J., D. I. D. Arini., J. Halawane., L. Nurani., Y. Kafiar., M. C. Karundeng dan Halidah. 2011. *Tumbuhan Obat Tradidional di Sulawesi Utara Jilid II*. Balai Penelitian Kehutanan Manado Badan Penelitian dan Pengembangan Kehutanan Kementrian Kehutanan.
- Kiong, A. L. P., H. H. Huan dan S. Hussein. 2008. Callus Induction From Leaf Explants of *Melalauca alternifolia*. *International Journal of Agriculture Reasearch*. 2(3): 227-237.
- Lemmens, R. H. M. J. and N. Buyapraphatsara. 2003. Plant Resources of South-East Asia No. 12. *Medical and Poisonous Plants 3. Prosea Foundation, Bogor, Indonesia*.
- Manoi, F. 2008. Sarang Semut (*Mymercodia*) Tanaman Obat Berpotensi Menyembuhkan Berbagai Penyakit. *Warta Penelitian dan Pengembangan Tanaman Industri* 14 (1).
- Manitto, P. 2002. *Biosintesis Produk Alami*. IKIP Semarang Press. Semarang.
- Manthell and Smith. 1983. Cultural Factor that Influence Secondary Metabolites Accumulation in Plant Cell & Tissue Culture. *In: Plant Biotechnology*. Manthell S. H. & Smith (eds). Cambridge: *Cambridge Univ. Press*.
- Mehta, J., A. Sharma., N. Sharma., S. Megwal., G. Sharma., P. Gehlot and R. Naruka. 2013. An Improved Method For Callus Culture And Invintro Propagation Of Garlic (*Allium sativum* L.). *International Journal Of Pure And Applied Bioscience*. 1 (1): 1-6.
- Meenakshi, S., Umayaparvath, S., Arumugan, M. and Balasubramanian, T. 2012. In vitro antioxidant properies and FTIR analysis of two seaweeds of Gulf of Manar. *Asian Pac. Journal Tropic. Bioremed.*, 2: 66-70
- Molyneux, P. 2004. The Use of The Table Free Radical *Diphenyl Picrylhydrazyl* (DPPH) For Estimating Antioxidant Activity. *Songklanakarinn J. Science Technology*, 26:211-219.
- Nurchayati, Y. dan Afiah, F., 2010, Kandungan Asam Askorbat Pada Kultur Kalus Rosela (*Hibiscus Sabdariffa* L.) Dengan Variasi Konsentrasi Sukrosa Dalam Media MS, *Majalah Obat Tradisional*, 15(2), 71-74.

- Safaa Y.Q., Ahmed N.A. & Mona A.L. Screening of antioxidant activity and phenolic content of selected food items cited in the holly quran. *E-Journal Biochemistry of Science* 2(1): 40-51. 2010.
- Sada, J. T dan H. R. Tanjung. 2010. Keragaman Tanaman Obat Troditional di Kampung Nansfori Distrik Supiori Utara, Kab. Supion-Papua. *Jurnal Biologi Papua ISSN: 2086-3314 Volume 2, Nomor 2 Oktober 2010 Halaman: 39-46. Jurusan Biologi FMIPA Universitas Cendrawasih, Jayapura-Papua.*
- Salisbury, F. B. dan C.W. Ross. 1995. *Fisiologi Tumbuhan Jilid 2*. ITB. Bandung
- Sari, Y. P., C. Saleh., E. Kusumawati., W. Kustiawan dan Sukartiningsih. Effect of sucrose and plant growth regulators on callogenesis and preliminary secondary metabolic of different explant *Myrmecodia tuberosa*. *Nusantara Bioscience* 10(3): 183-192. 2018
- Sari, Y. P., C. Saleh., E. Kusumawati dan R. A. Nugroho. 2018. *Potensi Sarang Semut Sebagai Bahan Fitofarmakokimia*. Samarinda. Mulawarman University Press.
- Samadi, B. 2016. *Usaha Tani Bawang Putih, Pengembangan Bawang Putih Dataran Tinggi dan Dataran Rendah*. Jakarta: Kanisius.
- Sastrohamidjojo, H. 1996. *Sintesis Bahan Alam*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Subroto dan H. Saputro., 2008. *Gempur Penyakit dengan Sarang Semut*. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Susetya, D. 2012. *Khasiat & Manfaat Daun Ajaib Binahong*. Yogyakarta: Pustaka Baru Press.
- Sivanesan I., K. E. Kyong., K. M. Kyong., K. E. Young., S. W. Park.; 2015. Somatic Embryogenesis And Plant Regeneration From Zygotic Embryo Explants Of Onion. *Konkuk University, Seoul, Republic of Korea Horticultura Brasileira* 33: 441-447
- Sulichantini, E. D. 2016. Pengaruh Konsentrasi Zat Pengatur Tumbuh Terhadap Regensai Bawang Putih (*Allium sativum* L.) Secara Kultur Jaringan. *Jurnal Agrofor*. 15 (1): 29-36.
- Suryanto, R dan D. K. Setiawan., 2013. *Struktur Data Datawarehouse Tanaman Obat Indonesia dan Hasil Penelitian Obat Traditional*. Seminar Nasional Sistem Informatika Indonesia 2-4 Desember 2013. Fakultas Informatika Maranatha. Bandung.
- Sukmara. E., L. A. Sukanto dan M. Bintang. 2014. Induksi dan Karakter Pertumbuhan Kalus Triploid dari Endosperma Avokad (*Persea americana* Mill.). *Jurnal Biochemistry*. 1(1): 20-28.
- Suryowinoto, M. 1996. *Pemuliaan Tanaman secara In Vitro*. Kanisius. Yogyakarta.
- Syamsiah, I. S., dan Tajudin. 2003. *Khasiat dan Manfaat Bawang Putih*. Jakarta : Agromedia Pustaka.
- Tan, S. H., R. Musa, A. Arriff dan M. Maziah. Effect of Plant Growth Regulators on Callus, Cell Suspension and Cell Line Selection for Flavonoid Production

from Pegaga (*Centella asiatica* L. Urban). *American Journal of Biochemistry and Biothechnology*. 6 (4):284-299

- Utami, P. dan L. Mardiana. 2013. *Umbi Ajaib Tumpas Penyakit*. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Wardani, D. P., Solichatun dan D. S. Ahmad. 2003. Pertumbuhan dan Produksi Saponin Kultur Kalus Talinum. Universitas Sebelas Maret. Surakarta. *Biofarmasi* 2 (1): 35-43.
- Widi, R.K, dan Indriati T, 2007, Penjaringan dan Identifikasi Senyawa Alkaloid dalam Batang Kayu Kuning (*Arcangelisia Flava* Merr), *Jurnal Ilmu Dasar* 8 (1) : 24–29
- Yuhernita dan Juniarti. 2011. Analisis Senyawa Metabolit Sekunder dari Ekstrak Metanol Daun Surian Yang Berpotensi Sebagai Antioksidan. *Makara, Sains* 15 (1): 48-52.
- Yusnita. 2003. *Kultur Jaringan Cara Memperbanyak Tanaman Secara Efisien*. Agromedia Pustaka. Bogor.
- Zulhilmi, Suwirman & Surya, N. W. 2012. Pertumbuhan dan Uji Kualitatif Kandungan Metabolit Sekunder Kalus Gatang (*Spilanthes acmella* Murr.) dengan Penambahan PEG untuk Menginduksi Cekaman Kekeringan. *Jurnal Biologi Universitas Andalas* 1(1): 1-8
- Zulkarnain. 2009. *Kultur Jaringan Tanaman*. Bumi Aksara. Jakarta.

LAMPIRAN

Lampiran III. Surat Pernyataan Keaslian Penelitian

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama Lengkap	Dr. Yanti Puspita Sari, M. Si
NIP /NIDN	19740304 200012 2 001 / 0004037404
Alamat	Jl. Pakis Merah 15. No 590, Blok D, Bengkuring, Samarinda

Dengan ini menyatakan bahwa penelitian saya yang berjudul : Potensi ekstrak kalus tanaman bawang putih tunggal (*Allium sativum* L.) Hasil *in vitro* sebagai antioksidan yang didanai dari Skim Bantuan Biaya Penelitian PNBP Tahun 2019 ini bersifat asli dan belum pernah dibiayai oleh lembaga/sumber dana lainnya. Bila mana dikemudian hari ditemukan ketidaksesuaian dengan pernyataan ini, maka saya bersedia dituntut dan diproses sesuai dengan ketentuan yang berlaku dan mengembalikan seluruh biaya penelitian yang sudah diterima ke kas negara. Demikian pernyataan ini dibuat dengan sesungguhnya.

Samarinda, 30 April 2019
Ketua Tim

Dr. Yanti Puspita Sari, M. Si
NIP. 19740304 200012 2 001

Data Penelitian
Instrumen Penelitian
Surat Perjanjian Kerja Penelitian

D. Surat Pernyataan Keaslian Penelitian

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama Lengkap	Dr. Yanti Puspita Sari, M. Si
NIP /NIDN	19740304 200012 2 001 / 0004037404
Alamat	Jl. Pakis Merah 15. No 590, Blok D, Bengkuring, Samarinda

Dengan ini menyatakan bahwa penelitian saya yang berjudul: Potensi ekstrak kalus tanaman bawang putih tunggal (*Allium sativum* L.) hasil *in vitro* sebagai antioksidan yang didanai dari Skim Bantuan Biaya Penelitian PNBPN Tahun 2019 ini bersifat asli dan belum pernah dibiayai oleh lembaga/sumber dana lainnya. Bila mana dikemudian hari ditemukan ketidaksesuaian dengan pernyataan ini, maka saya bersedia dituntut dan diproses sesuai dengan ketentuan yang berlaku dan mengembalikan seluruh biaya penelitian yang sudah diterima ke kas negara. Demikian pernyataan ini dibuat dengan sesungguhnya.

Samarinda, 30 Agustus 2019
Ketua Tim

Dr. Yanti Puspita Sari, M. Si
NIP. 19740304 200012 2 001

Manuscript:

THE POTENTIAL OF ANTIOXIDANT SINGLE BULB GARLIC CALLUS (*Allium sativum* L.) EXTRACT FROM IN VITRO METHOD

Yanti Puspita Sari¹♥, Chairul Shaleh² dan Merdi Sahara Anwar¹

¹Tissue Culture Laboratory, Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Mulawarman University. Jl. Barong Tongkok No. 4, Kampus Gn. Kelua, Samarinda, 75119, Kalimantan Timur, Indonesia. Tel.: +62-541 747974, Fax: +62-541-747974, ♥email (corresponding author): ypsman2002@yahoo.com

² Department of Chemistry, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Mulawarman University

Abstract

The phytochemical and antioxidant activities of single bulb garlic (*Allium sativum*) callus are presented. The addition of sucrose can affect the secondary metabolites content through callus by in vitro method. The experiment was designed to investigate the potentiality antioxidant activities of single bulb garlic callus with sucrose addition (30, 60, 90 and 120 g). Data obtained from callus wet weight were analyzed using variance (ANOVA) and followed by Tukey test while antioxidant activity was evaluated by DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) method. The best callus produced at the addition of 90 gL⁻¹ of sucrose into Murashige Skoog medium with wet weight of 5.29 g, yellowish white callus color and crumb texture. Result from phytochemical analysis showed that single bulb garlic callus positively contained the secondary metabolic compounds including phenolics, alkaloids, saponins and triterpenoid. The highest total phenolic content and antioxidant activity was found in the treatment with sucrose 90 gL⁻¹ with TPC value of 31.41± 0.162 mg GAE/g and an IC₅₀ value of 33.78 µg mL⁻¹. The result showed callus of single bulb garlic is potential for the development as an antioxidant agent.

Keywords: Single bulb garlic (*Allium sativum* L.), sucrose, callus, antioxidant activity

INTRODUCTION

Garlic is belongs to family Alliaceae and used for food and medicinal purposes. Its beneficial effect on antibiotic, anticancer, antiantherosclerosis, cardiovascular diseases, anti-inflammatory, hypoglycemic and hormone like affect (Hile et al., 2004; Milner, 2001; Palaksha et al., 2010; Rahman, 2001). Researches showed that allicin (diallyl-dithiosulfinate) are chemical compound to be responsible for their beneficial effects (Mikaili et al., 2013). Commonly multi bulb garlic is used as medicines but some traditional doctors are using single bulb garlic as medicine due to its strong therapeutically properties. Traditionally more therapeutic use of single bulb Garlic may be due to its high level of volatile oil and its substances as compared to multi bulb Garlic (Bharat, 2014). Comparison of allicin in single bulb is equal to 5-6 bulb of garlic. This is due to all active compound collected in a single bulb and because of that more single bulb garlic was consumed as medicine (Utami, 2013).

Single bulb garlic breeding has a major problem because it is done conventionally. This plant only produces vegetative shoots and does not produce seeds (sterile) which results in increasingly difficult growth. Because of this, the price of single bulb garlic is more expensive and cannot meet high consumer demand. Thus, there is an urgent need to use an alternative pharmaceutical source without taking it directly from nature.

The tissue culture approach is an option to supply material to generate a therapeutic compound to obtain significant benefits in the pharmaceutical field (Radha et al., 2011) and to prefer genotypes that have substantial quantities of bioactive compound (Cantelmo et al., 2013). Generally, organ culture, cell suspension, and callus culture have been used to study

secondary metabolite synthesis using the tissue culture method (Geoge & Sherrington, 1984; Smetanska, 2008). Plant cells in callus has advantages for producing the active constituents by defined system of production and also it take short time, this technique provide us with continuous supply of such important secondary metabolites, furthermore callus cells are free from diseases, not affected by climate changes and sometimes give us new active constituents which not found in original plant. In addition, a high quality of callus can be produced using specific nutrients and manipulate nutrient components in the culture medium (e.g., carbon source, nitrogen, and phosphate) to induce cell growth for effectiveness of secondary metabolite production (Trejo-Tapia et al., 2001).

The production of secondary metabolites both in cell and organ cultures could be influenced by sucrose (Fowler, 1983; Paiva & Janick, 1982). The effect sucrose concentration (i.e 30, 60, 90 and 120 gL⁻¹) was investigated in callus of ant nest plant and found that metabolite content was positive contained flavonoids, phenols, alkaloids, and steroids(Sari et al., 2018). In addition, a sugar feeding strategy was formulated to enhance the saponin accumulation by notoginseng cells (Zhang et al., 1996). Sucrose concentration (5, 7, and 9% w/v) showed increased accumulation of phenols, flavonoids, chlorogenic acid, and total hypericin in adventitious root cultures of *Hypericum perforatum* L (Cui et al., 2010). The sucrose concentration (i.e. 20, 30, 40 and 60 gL⁻¹) was also investigated in suspension cultures of *Panax notoginseng* for production of ginseng saponin (secondary metabolite) and polysaccharide (primary metabolite). Sucrose levels below 6-9% did not significantly alter the specific alkaloid content, but biomass production by *Solanum aviculare* hairy roots was maximum and about 60% higher than in 3% sucrose medium when the initial sucrose concentration was 4-6% (Yu et al., 1996). The suitable medium for both biomass Brahmi (*Bacopa monnieri*) (6.31 ± 0.12 g fresh weight and 250 ± 5.00 mg dry weight) and bacoside A accumulation (13.09 mg g⁻¹ dry wt) found in MS medium supplemented with 2% sucrose and pH set at 4.5.

Based on the information above, the purpose of this research was to evaluate the optimum sucrose concentration to enhance secondary metabolite production from the single bulb garlic callus. No published about the effect of sucrosa in increasing secondary metabolites on garlic callus especially single bulb garlic.

MATERIALS AND METHODS

Plant materials

The research material used in this study was single bulb garlic (*A. sativum*) var. lanang. Papery bulb scales of the cloves were removed. The cloves used as explant.

Sample preparation

The cloves were rinsed with running water and then washed again with detergent for 30 minutes, soaked in fungicide thoroughly by adding a few drops of tween-20 for 30 minutes to remove the particles as well as fungal spores. They were surface sterilized with 70% ethanol for 1 minute, 10% HgCl₂ containing 3 drops tween for 10 minute followed by rinsing them three times with double distilled water (Demeke, 2014). Embryo, were excised from the cloves aseptically inside a flow cabinet and devide into 2 part, which were used as the initial explants.

Callus Induction

Explant were scratched and placed in MS medium (Murashige & Skoog, 1962) supplemented with picloram 5 m gL⁻¹ and agar 7.5 gL⁻¹ with sucrose treatment (30, 60, 90 and 120 gL⁻¹). Culture callus incubation was performed at 25 ± 2 0C and 16 h photoperiod (light 18 W by fluorescent tubes). All the treatment were repeated three times for each treatment. The callus morphology and fresh weight callus were recorded after four weeks of incubation. Thirty days older, callus was subculture in same medium for material secondary metabolite test.

The extraction of secondary metabolites

The callus was extracted using ethanol as a solvent for 48 h. The extraction process continued until the extraction solution become clear (\pm 48 h) followed by filtration using Whatman paper (Whatman 2; Sigma-Aldrich, Germany). After filtration, a rotary evaporator was used to evaporate the remaining solvent. The extracted ethanol was then collected to be used as a sample extract in the phytochemical test to determine the phytochemical contents in the single bulb garlic callus extract.

Phytochemical analysis

The phytochemical analysis was done by testing the extract samples to determine the active compound using the description published by Pal et al. (2012) such as:

Alkaloid test (Mayer's test). One mL of Wagner's reagent was added. In this test, the white cloud will be formed if or it contains alkaloid compound.

Flavonoids test (Shinoda's test). The filtrate sample of 5 mL was added with 0.05 mg of Mg powder and 1 mL of concentrated HCl, which were then shaken. The positive test was indicated by the formation of red, yellow or orange.

Phenolic test. Few drops of 1% FeCl₃ was added. The positive extract contained phenols if it produced green, red, purple, blue or black.

Saponin test (Foam test). Extract samples were inserted into a test tube and added with 10 mL of hot water and then were cooled. Samples were then shaken vigorously for 10 seconds. If there were saponin contents in the tested extracts will form bubbles.

Steroids/triterpenoids test (Liebermann Burchard test).

The extract solution was added with glacial CH₃COOH and concentrated H₂SO₄ with a ratio of 20: 1. The positive test of extract samples containing steroid will form in blue or green, while for triterpenoids, it will give a red or purple color.

Determination of total phenols (Total Phenolic Content/TPC)

Gallic acid standard solution was made with several serial concentrations from 0 to 250 mg/L in methanol: water with ratio of 50: 50 v/v. 0.5 mL of callus extract was put into a test tube. Samples were then added to 5 mL of reagent Folin-Ciocalteu and 4 mL of 2% Na₂CO₃. Furthermore, samples were incubated at room temperature for 15 minutes. The absorbance was measured at a wavelength of +750 nm using a UV-Vis spectrophotometer (Shimadzu UV mini-1240) (Orak, 2007).

The total value of phenolic contents was calculated using the formula used by Kumari and Sharma (2015).

$$T = \frac{C \times V}{M}$$

Note:

T = Total phenolic content (mg GAE/g sample)/

C = The concentration of gallic acid/ (mg L⁻¹) V = volume of extract (mL)

M = weight of the extract (g)

DPPH Free Radical Scavenging Activity

The free radical scavenging activity of single bulb garlic callus, based on the scavenging activity of the stable DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radical, was determined using the method described by Brand-William et al. 1995 with modifications. A sample of callus (0.2 mL) was added to 0.2 mM DPPH dissolved in ethanol solution (0.5 mL). After incubating the solution at room temperature in the dark for 30 min, the absorbance was measured at 527 nm, and the radical scavenging activity was expressed as percent inhibition (Choi et al., 2014):

$$\text{DPPH inhibition (\%)} = \left(\frac{[AC - AS]}{AC} \right) \times 100$$

where AC was the absorbance of the control (blank), and AS was the absorbance of the extract.

Data analysis

The results were presented as descriptive data. Callus induction was observed at the first growth of the callus along with the percentage of callus growth, callus morphology texture and color), and callus growth intensity. For the phytochemical test, the presence or absence of phytochemicals such as alkaloids, flavonoids, phenols, saponins, triterpenoids, and steroids in the extract was indicated as positive (presence) or negative (absence). Weight of callus which were obtained after various concentration of sucrose treatment were analysed by using ANOVA (SPSS 22, Inc., USA), followed by Tukey's post hoc test to evaluate any significant differences at $p < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

Callus induction

Callus derived from single bulb garlic embryo planted on the medium media containing 5 mgL⁻¹ picloram and a variation of sucrose concentration (30, 60, 90 and 120 g / L). All treatment combinations of growth regulators resulted in calli with a percentage of 100% (Table 1). Callogenesis is the initial response, defined by the development of a callus, start from the edge of the explant (wound part) at the top and bottom, which has direct contact with the media. The callus is formed more quickly on the part that has direct contact with the media. This is probably related to the process of nutrient uptake by the explant in the medium. The development of the callus on the injured component can be triggered by the agitation of the tissue on the explant to protect the wound. Geoge and Sherrington (1984) claimed that the cell division which contributes to the development of calluses is triggered by wounds and by both the natural and artificial hormone supply from the outside to the explant.

The callus is formed at 3 weeks of age, marked by explant swelling and callus formation in the edge, slice, or lesion of the explant. The callus is fully formed at embryo surface after 6 weeks. This is related to the uptake of nutrition in the medium by the explant. The absorption of nutrients is even better with direct contact between the medium and explant.

Table 1. Callus morphology and average of weights of the callus of the single bulb garlic (*Allium sativum*) treated with different concentrations of sucrose for 12 weeks

Sucrose (g)	Percentage of callus formation (%)	Callus morphology		Mean weight of callus (g)
		Colour	Texture	
30	100%	White	Friable	2.84±1.50a
60	100%	White	Friable	3.44±1.86b
90	100%	Yellowish white	Friable	5.29±2.09d
120	100%	Yellowish white	Friable	4.19±1.62c

Note: Different letters (a, b, c) indicate significantly different means for different treatments at $p < 0.05$ using Tukey's test

Callus morphology

Single bulb garlic (*A. sativum*) has good ability to the formation of callus on medium containing picloram and sucrose combination. Formation of callus was characterized by appearance of clumps white cells. Furthermore these clumps develop to cell massa called callus. Tan et al. (2010) stated that picloram was one of growth regulator which can form callus compared to other types of auxin.

Figure 1. Callus of the single bulb garlic (*Allium sativum* L.) with different concentrations of sucrose. A. 30 gL⁻¹, B. 60 gL⁻¹, C. 90 gL⁻¹ D. 120 gL⁻¹ for 12 weeks. Bar = 1 cm

The results of the observation for 12 weeks after planting found that the combination of growth regulator picloram and sucrose treatment on the MS medium induced the formation of a callus on various explants from single bulb garlic (Figure 1). The color of the callus at all treatments ranged from white and yellowish white. The resulting color variations may be due to the different types of growth regulators, the difference in concentration of growth regulators and the type of explant (George et al., 2008). According to Afshari et al. (2011), the various color conditions of the callus could be induced by the pigmentation, the effect of light and the crop parts used as the origin explant. Light is an outside factor that influences the development of the callus. The variation of color that occurs in the callus is attributed to coloring, vitamins and environmental factors such as light (Evans et al., 2003). Geoge and Sherrington (1984) concluded that sucrose in tissue culture media that inhibit chlorophyll synthesis with varying levels of inhibition depending on the type of tissue and plant species. Accumulation of sucrose in cells may also impede the mechanism of photosynthesis due to the accumulation of sucrose in the cell, which allows the requirement for sugar in the cell to be satisfied. As a result, the cells inhibit photosynthesis and the formation of chlorophyll and produces white-yellowish white callus

Table 1 shows friable callus was found in calli with all treatments. The friable callus was formed through the growth of cells at a small size and loose cell interaction that was affected by the occurrence of auxin. Picloram belong to auksin was beneficial to induce callus formation. In line with past research studies, the addition of 3.0 - 5.0 mg L⁻¹. Picloram was found to be effective in promoting callus proliferation from immature leaf explants of durian (Zulkarnain et al., 2013), and 2 mg L⁻¹ picloram produced friable callus from leaf explant of *Verbena bipinnatifida* Nutt (Genady, 2017).

Friable callus contain much water because the wall cell has not reached lignification yet, and the group of cells can be easily separated from the others. The callus texture from the explant can be distinguished as friable and non-friable. The non-friable callus has compact and tight cells that are difficult to separate. In contrast, a friable callus from an explant has loose cell interaction that is easily detached using tweezers. The friable callus was also obtained in a study conducted by Sari and Kusuma (2015), which reported that the friable callus was also obtained on ant nest cotyledons planted in solid and liquid MS media.

Callus growth

The weight gain of the callus was significantly affected by different concentrations of sucrose. The largest mean (5.29 ± 2.09 g) of callus weight of the single bulb garlic callus was found in sucrose-treated medium at 90 gL⁻¹ (Table 1). However, the sucrose-treated medium leads to reduced callus weight. In the treatment of 120 gL⁻¹, sucrose decreased the weight of the callus to 4.19 ± 1.62 g. This was due to the increasing concentration of medium that inhibited the absorption of water and minerals. Lindsey and Yeoman (1983) argued that inhibition of growth in cultures that produced secondary metabolites was likely due to competition between primary metabolism and secondary metabolism of the same substance.

Growth in tissue culture may be characterized by a rise in the wet weight of the calluses. Physiologically, the weight of the wet callus comprises of moisture and carbohydrates linked to sucrose in the culture medium as a carbon source and osmotic controller essential to the development of embryos and calluses (Last & Brettell, 1990). Sucrose can be easily hydrolyzed to contain glucose and fructose, thereby increasing the osmolality of the material. In this analysis, the sucrose-treated medium reached the plant cell by diffusion and osmosis. Shahnewaz and Bari (2004) have shown that the impact of sucrose concentration affects the rate of initiation of the callus, which may be attributed to its relation to the osmotic ability of the medium rather than its use as a carbon source. During cell metabolism, glucose and fructose

join the glycolysis and cancer process to produce ATP for use in the production of calluses. Perry et al. (1987) showed that a shift in the solute content (e.g. carbon source) may contribute to a number of improvements in turgor and osmotic turgor. In tissue culture, the pressure of the turgor can induce elongation and magnification of the callus cells. In fact, the turgor stress may be specific in each cell and the cell growth reaction to the introduction of carbohydrates often vary for each organism.

Phytochemical test

The phytochemical test results of the callus of single bulb garlic with different concentrations of sucrose are shown in Table 2.

Table 2. Phytochemical screening test of the single bulb garlic callus with different sucrose concentrations

Sucrose (g)	Alkaloid	Phenol	Flavonoid	Triterpenoid	Saponin
30 g	+	-	+	+	+
60 g	+	-	+	+	+
90 g	++	++	-	++	++
120 g	++	++	-	++	++

Note: + = contain secondary metabolites, - = had no secondary metabolites

The phytochemical test on the single bulb garlic calli treated with 90 and 120 sucrose concentrations (tested only sucrose treatment has a high phenolic as seen from the phytochemical test), found that metabolite content was positive contained phenols, alkaloids, saponin, triterpenoid and negative flavonoid, whereas 30 and 60 sucrose was found alkaloids, saponin, triterpenoid and negative flavonoid and phenols. 90 and 120 g sucrose treatment better than 30 and 60 g, resulting in a more concentrated test color than the others. Ana Hortencia et al, 2016 note that different active ingredients have been identified in medicinal plants, especially in the culture of callus tissues. According to Fowler (1983), the process of tissue culture can be used to generate chemical compounds that are normally extracted from the native plant, as well as novel synthesis compounds that are not generated by the plant. The secondary metabolites synthesized from the explant with the tissue culture depend on the culture condition. The proper culture produces secondary metabolites that are similar to those of the native plant. Sari et al. (2017) stated that the content of chemical compounds such as phenols, flavonoids, saponins, and alkaloids found in ant nests (tuber, stem and leaves). Phenolic compounds that are important for plant growth and reproduction are produced as defend wounded plants and response to environmental factors (light and cooling, contamination, etc.) (Kefeli et al., 2003). Apart from flavonoids and phenols, alkaloids have some pharmacological activity. Some of them are toxic to humans, but many can also be used in the medical field, such as raising blood pressure, reducing pain and combating microbial infections. In addition, alkaloids from plant are used as toxic substances to combat pests or fruit-eating animals (Saputro, 2008). Another secondary metabolite, saponin, the glycoside of triterpenes and steroids, is important for pharmaceuticals. However, the under-explored ecosystem of crop saponins is likely to prove a vital resource for future drug development. Saponin is also one of the most widespread and diverse groups of natural plant products which perform a wide range of ecological roles, including plant disease and herbivore defense mechanisms and likely allelopathic agents in competitive plant interactions (Makkar et al., 2007).

Total of Phenolic Content (TPC)

Total phenolic content is only found in callus with 90 and 120 g sucrose treatments. The higher number of phenolic contents was obtained in 90 g sucrose was 31.41 ± 0.162 mg GAE/g than 120

g (Figure 2). The standard curve was used with the linear regression equation $y = 0,001x + 0,013$ and $R^2 = 0.814$.

Figure 2. The total number of phenolic contents of single bulb garlic callus with sucrose treatment

According to Safaa (2010) the phenolic content was grouped into three groups: high (> 70 mg GAE/g (fw) and > 400 mg GAE/g (dw)), moderate (10-70 mg GAE/g (fw) and 150-400 mg GAE/g (dw)) and low (< 10 mg GAE/g (fw), < 150 mg GAE/g (dw)). Based on the above classification, the TPC value produced by a single garlic callus extract at 90 and 120 grL-1 was included in the moderate activity. Abdel Gawad et al. (2021) reported that 6 *Allium* species from Egypt had TPC and TFC value varies with different fractions and included in the high-moderate.

Phenol compounds are known to have antioxidant activity. Phenol compounds are secondary metabolites that play a role in the maintenance of the human body. The presence of chemical substances in plants such as phenols, flavonoids and tannins indicates the possibility of antioxidant activity and free radical antidote activity (Meenakshi et al., 2011). These phenolic compounds have one or more phenolic groups for hydrogen proton donors and neutralize free radicals (Igbiosa et al., 2011).

Figure 3. Antioxidant activities of single bulb garlic callus with sucrose treatment

Antioxidant activity

IC₅₀ defined as the concentration of substrate that causes 50% loss of the DPPH activity. The higher the antioxidant activity, the lower is the value of IC₅₀ (Molyneux, 2004). IC₅₀ values in single bulb garlic callus with sucrose 90 gL-1 (33.78 μ g mL-1) and 120 gL-1 (41.46 μ g mL-1) were lower than the standard solution (vitamin C) (figure 3). It's means that single bulb garlic callus with sucrose concentrations of 90 and 120 g had higher antioxidant activity than vitamin C. Molyneux (2004) states that the smaller the IC₅₀ value, the higher the antioxidant activity. According to Prior and Cao (2000) many phenolics, have antioxidant capacities that are much stronger than those of vitamin C and E.

Safaa (2010) stated that antioxidant activity was grouped into three groups : high antioxidant activity (1 mg/ml $<$ IC₅₀ $<$ 10 mg/ml (fw) and 0.01 $<$ IC₅₀ $<$ 1 mg/ml (dw)), moderate activity (10 mg/ml $<$ IC₅₀ $<$ 30 mg/ml (fw) and 1mg/ml $<$ IC₅₀ $<$ 7 mg/ml (dw)) and low activity (IC₅₀ $>$ 30 mg/ml (fw) and IC₅₀ $>$ 7 mg/ml (dw)). Single bulb garlic callus had high antioksidant activity with 33.78 μ g mL-1 and 41.46 μ g mL-1 value. Antioxidants are exogenous or endogenous molecules that shield the body cells from the harmful effects of the Reactive Oxygen Species (ROS) by scavenging free radicals to improve antioxidant resistance (Kurutas, 2015). The results of the antioxidant activity related to the phenol contents. In line with Maizura et al (2011) several studies reported that antioxidant properties of several plant extracts associated with their phenolic contents. Abdel Gawad et al. (2021) stated that the antioxidant power of the tested *Allium* species depend on their phenolic contents.

In summary, the present study showed that alkaloid, phenol, saponin, and triterpenoid are found in the secondary metabolites of the single bulb garlic callus. In addition 90 gL-1 sucrose treatment have the highest total phenolic contents and antioxidant potential. The antioxidant properties of the methanolic extract was well correlated with their total phenolic

contents. Therefore, the daily consumption of single bulb garlic in our food or supplements can help the antioxidant systems of the body to reduce the harmful effects oxidative stress.

REFERENCES

- Abdel Gawad, M., Abdel-Aziz, M., El-Sayed, M., El-Wakil, E., & Abdel-Lateef, E. (2021). In vitro antioxidant, total phenolic and flavonoid contents of six *Allium* species growing in Egypt. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2021, 343-346.
- Afshari, R., Angoshtari, R., & Kalantari, S. (2011). Effects of Light and Different Plant Growth Regulators on Induction of Callus Growth in Rapeseed (*Brassica napus* L.) Genotypes. *Plant Omics*, 4(2), 60-67.
- Bharat, P. (2014). Comparative Analytical Study Of Single Bulb And Multi Bulb Garlic (*Allium Sativum* Linn). *International Journal Of Ayuverda Alternative Medicine*, 2(4).
- Cantelmo, L., Soares, B., Rocha, L., Pettinelli, J., Callado, C., Mansur, E., Castellar, A., & Gagliardi, R. (2013). Repetitive somatic embryogenesis from leaves of the medicinal plant *Petiveria alliacea* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 115(3), 385-393.
- Choi, I. S., Cha, H. S., & Lee, Y. S. (2014). Physicochemical and antioxidant properties of black garlic. *Molecules*, 19(10), 16811-16823.
- Cui, X.-H., Murthy, H. N., Wu, C.-H., & Paek, K.-Y. (2010). Sucrose-induced osmotic stress affects biomass, metabolite, and antioxidant levels in root suspension cultures of *Hypericum perforatum* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 103(1), 7-14.
- Evans, D., Coleman, J., & Kearns, A. (2003). Callus cultures. *Basics Plant Tissue Culture*. BIOS Scientific Publishers, New York, 63-67.
- Fowler, M. (1983). Commercial applications and economic aspects of mass plant cell culture. Seminar series-Society for Experimental Biology,
- Genady, E. A. (2017). Influence of 2, 4-D and picloram on in vitro callus induction from *Verbena bipinnatifida* Nutt. and evaluation of in vivo anti-inflammatory activity of callus extract. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 5.
- George, E. F., & Sherrington, P. D. (1984). *Plant propagation by tissue culture: handbook and directory of commercial laboratories*. Exegetics Limited.
- George, E. F., Hall, M. A., & De Klerk, G.-J. (2008). Plant growth regulators II: cytokinins, their analogues and antagonists. In *Plant propagation by tissue culture* (pp. 205-226). Springer.
- Hile, A. G., Shan, Z., Zhang, S.-Z., & Block, E. (2004). Aversion of European starlings (*Sturnus vulgaris*) to garlic oil treated granules: garlic oil as an avian repellent. Garlic oil analysis by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(8), 2192-2196.
- Igbinosa, O. O., Igbinosa, I. H., Chigor, V. N., Uzunugbe, O. E., Oyedemi, S. O., Odjadjare, E. E., Okoh, A. I., & Igbinosa, E. O. (2011). Polyphenolic contents and antioxidant potential of stem bark extracts from *Jatropha curcas* (Linn). *International Journal of Molecular Sciences*, 12(5), 2958-2971.
- Kefeli, V. I., Kalevitch, M. V., & Borsari, B. (2003). Phenolic cycle in plants and environment. *J. Cell Mol. Biol*, 2(1), 13-18.
- Kumari, A., & Sharma, R. A. (2015). Estimation of total phenol, flavonoid contents and DPPH free radical scavenging activity of *Oxalis corniculata* Linn. *Int. J. Biol. Pharm. Res*, 6, 178-181.
- Kurutas, E. B. (2015). The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. *Nutrition journal*, 15(1), 1-22.
- Kusuma, Y. P. S. R. (2015). Modification of sucrose concentration in solidand liquid medium for *Myrmecodia tuberosa* jack callus growth invitro. *Bio Wallacea Jurnal Ilmiah Ilmu Biologi* 1, 9-13.
- Last, D. I., & Brettell, R. I. (1990). Embryo yield in wheat anther culture is influenced by the choice of sugar in the culture medium. *Plant Cell Reports*, 9(1), 14-16.
- Lindsey, K., & Yeoman, M. (1983). The relationship between growth rate, differentiation and alkaloid accumulation in cell cultures. *Journal of Experimental Botany*, 34(8), 1055-1065.

Makkar, H. P., Siddhuraju, P., & Becker, K. (2007). Plant secondary metabolites. Humana Press.

Meenakshi, S., Umayaparvathi, S., Arumugam, M., & Balasubramanian, T. (2011). In vitro antioxidant properties and FTIR analysis of two seaweeds of Gulf of Mannar. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1(1), S66-S70.

Mikaili, P., Maadirad, S., Moloudizargari, M., Aghajanshakeri, S., & Sarahroodi, S. (2013). Therapeutic uses and pharmacological properties of garlic, shallot, and their biologically active compounds. *Iranian journal of basic medical sciences*, 16(10), 1031.

Milner, J. (2001). A historical perspective on garlic and cancer. *The journal of nutrition*, 131(3), 1027S-1031S.

Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. sci. technol*, 26(2), 211-219.

Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.

Orak, H. H. (2007). Total antioxidant activities, phenolics, anthocyanins, polyphenoloxidase activities of selected red grape cultivars and their correlations. *Scientia Horticulturae*, 111(3), 235-241.

Paiva, M., & Janick, J. (1982). In vivo and in vitro production of alkaloids in theobroma cacao l.

Pal, R., Girhepunje, K., Upadhayay, A., & Thirumoorthy, N. (2012). Antioxidant and free radical scavenging activity of ethanolic extract of the root of *Morinda citrifolia* (Rubiaceae). *African journal of pharmacy and pharmacology*, 6(5), 278-282.

Palaksha, M., Ahmed, M., & Das, S. (2010). Antibacterial activity of garlic extract on streptomycin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* solely and in synergism with streptomycin. *Journal of natural science, biology, and medicine*, 1(1), 12.

Perry, C. A., Leigh, R. A., Tomos, A. D., Wyse, R. E., & Hall, J. (1987). The regulation of turgor pressure during sucrose mobilisation and salt accumulation by excised storage-root tissue of red beet. *Planta*, 170(3), 353-361.

Radha, R., Shereena, S., Divya, K., Krishnan, P., & Seeni, S. (2011). In vitro propagation of *Rubia cordifolia* Linn., a medicinal plant of the Western Ghats. *International Journal of Botany*, 7(1), 90-96.

Rahman, K. (2001). Historical perspective on garlic and cardiovascular disease. *The journal of nutrition*, 131(3), 977S-979S.

Safaa, Y. Q. (2010). Screening of antioxidant activity and phenolic content of selected food items cited in the holly quran. *E-Journal Biochemistry of Science* 2, 40-51, Article 1.

Saputro, M. A. S. H. (2008). Fight the disease with the ant nest plant. *Penebar Swadaya*.

Sari, Y. P., Kustiawan, W., SUKARTININGSIH, S., & Ruchaemi, A. (2017). The potential of secondary metabolites of *Myrmecodia tuberosa* from different host trees. *Nusantara Bioscience*, 9(2), 170-174.

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

Shahnewaz, S., & Bari, M. (2004). Effect of concentration of sucrose on the frequency of callus induction and plant regeneration in anther culture of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Tissue Cult*, 14(1), 37-43.

Smetanska, I. (2008). Production of secondary metabolites using plant cell cultures. *Food biotechnology*, 187-228.

Tan, S., Radzali, M., Arbakariya, A., & Mahmood, M. (2010). Effect of plant growth regulators on callus, cell suspension and cell line selection for flavonoid production from pegaga (*Centella asiatica* L. urban). *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 6(4), 284-299.

Trejo-Tapia, G., Jimenez-Aparicio, A., Rodriguez-Monroy, M., De Jesus-Sanchez, A., & Gutierrez-Lopez, G. (2001). Influence of cobalt and other microelements on the production of betalains and the growth of suspension cultures of *Beta vulgaris*. *Plant cell, tissue and organ culture*, 67(1), 19-23.

- Utami, P. (2013). *Miraculous Bulbs Eradicate Disease*. Penebar Swadaya.
- Yu, S., Kwok, K. H., & Doran, P. M. (1996). Effect of sucrose, exogenous product concentration, and other culture conditions on growth and steroidal alkaloid production by *Solanum aviculare* hairy roots. *Enzyme and microbial technology*, 18(4), 238-243.
- Zhang, Y.-H., Zhong, J.-j., & Yu, J.-T. (1996). Enhancement of ginseng saponin production in suspension cultures of *Panax notoginseng*: manipulation of medium sucrose. *Journal of Biotechnology*, 51(1), 49-56.
- Zulkarnain, Z., Neliyati, N., & Lizawati, L. (2013). Callus proliferation from immature leaf explants of durian (*Durio zibethinus* Murr. cv. Selat) with the addition of Picloram and BAP. *Jurnal Hortikultura Indonesia (Indonesian Journal of Horticulture)*, 4(3), 107-114.