

Pengaruh Asam Salisilat Dan Fenilalanin Terhadap Kandungan Total Asam Fenol Pada Kultur Suspensi Sel *Moringa oleifera* Lam.

Yunita Permanasari, Nurul Jadid, dan Endry N. Prasetya

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS)

Jl. Arief Rahman Hakim, Surabaya 60111 Indonesia

e-mail: nuruljadid@bio.its.ac.id

Abstrak— *Moringa oleifera* merupakan tanaman yang berpotensi tinggi untuk dikembangkan dalam sektor industri seperti industri farmasi karena kandungan senyawa fenolnya yang tinggi. Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui pengaruh asam salisilat sebagai elisitor dan fenilalanin sebagai prekursor *feeding* terhadap kandungan total asam fenol pada kultur suspensi sel *M. oleifera*. Rancangan penelitian yang digunakan adalah RAL (rancangan acak lengkap) dengan ulangan sebanyak 3 kali. Parameter uji yang dilakukan adalah estimasi senyawa total asam fenol menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan berat kering hasil perlakuan asam salisilat dan fenilalanin. Hasil dianalisa menggunakan anova one way dan uji Tukey. Hasil penelitian menunjukkan variasi konsentrasi asam salisilat dan fenilalanin berpengaruh terhadap peningkatan kandungan total asam fenol pada kultur suspensi sel *M. oleifera* Lam. dimana total asam fenol tertinggi terdapat pada asam salisilat 1 ppm 1,6067 ± 0,458 ppm dan fenilalanin 5 ppm 1,60 ± 0,37 ppm..

Kata Kunci— asam fenol, asam salisilat, fenilalanin, *M. oleifera*

I. PENDAHULUAN

Moringa oleifera merupakan tanaman yang berpotensi tinggi untuk dikembangkan dalam sektor industri seperti industri farmasi, makanan, dan kosmetik [1]. Keberadaan tanaman ini melimpah di Indonesia termasuk di pulau Madura [2] dan Nusa Tenggara Timur [3]. Masyarakat di Indonesia biasanya menyebut *M. oleifera* sebagai kelor (jawa) dan maronggi (madura) [4]. Selama ini pemanfaatan tanaman ini hanya terbatas sebagai sumber pangan, tanaman pagar hidup, batas tanah ataupun penjalar tanaman lain [3] seperti penopang tanaman cabe jamu [2].

M. oleifera telah diketahui sebagai tanaman yang kaya akan senyawa antioksidan [5]. Senyawa antioksidan adalah senyawa yang dapat menetralkan radikal bebas. Radikal bebas merupakan molekul yang tidak stabil dan sangat reaktif karena mengandung satu atau lebih elektron tidak berpasangan pada orbital terluarnya. Adanya reaksi ini dalam tubuh akan menimbulkan berbagai penyakit seperti kanker dan penyakit degeneratif lainnya [6]. Senyawa antioksidan yang terkandung pada *M. oleifera* yaitu polifenol, flavonoid, dan alkaloid [5]. Salah satu senyawa yang berperan penting sebagai antioksidan yaitu fenol yang terdiri dari quercetin, rutin, catechin, dan proanthocyanidin [7].

Senyawa metabolit sekunder yang menjadi fokus utama dalam penelitian akhir – akhir ini yaitu senyawa fenol karena berperan sebagai antioksidan untuk melawan penyakit kanker, kardiovaskular, neurodegeneratif [8], anti bakteri, dan anti tumor [9]. Akan tetapi, proses ekstraksi senyawa metabolit sekunder dari *M. oleifera* masih belum efektif karena membutuhkan material dalam jumlah besar, padahal waktu penanamannya lama dan lahan budidaya yang terbatas. Oleh karena itu, diperlukan langkah alternatif untuk meningkatkan produksi senyawa metabolit sekunder menggunakan kultur suspensi yang diberi perlakuan elisitor [10]. Langkah lain yang dapat digunakan adalah dengan menggunakan teknik prekursor *feeding* [11]. Elisitor yang biasa digunakan dalam proses ini adalah asam salisilat dan asam jasmonat [12]. Sedangkan prekursor *feeding* yang biasa digunakan adalah fenilalanin [13].

Fenilalanin merupakan prekursor metabolit pada jalur phenilpropanoid [13]. Penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa terdapat peningkatan kandungan senyawa total fenol pada kultur suspensi anggur menggunakan elisitor asam salisilat dan prekursor *feeding* fenilalanin [8]. Saat ini, penelitian mengenai pengaruh prekursor *feeding* dan elisitor terhadap kandungan total asam fenol pada *M. oleifera* masih belum dilakukan. Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui pengaruh asam salisilat sebagai elisitor dan fenilalanin sebagai prekursor *feeding* terhadap kandungan total asam fenol pada kultur suspensi sel *M. oleifera* Lam.

II. METODOLOGI

A. Waktu dan tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada Maret sampai Juli 2015 di Laboratorium Botani, Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman, Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi, dan Laboratorium Zoologi Biologi Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya.

B. Cara kerja

Pembuatan larutan stok dan media

Pembuatan stok ZPT 2,4, D 100 ppm dilakukan dengan menimbang 2,4, D (Phyto tech. Lab) sebanyak 10 mg menggunakan neraca analitik (Boeco, Germany), dimasukkan pada erlenmeyer, ditambahkan KOH 1N dan dipanaskan,

ditambah aquadest 50 ml sambil terus diaduk sampai homogen dan dipanaskan. Kemudian ditambah aquadest sampai 100 ml dan diaduk sampai homogen kembali. Larutan stok dituang pada botol kaca 200 ml dan ditutup dengan rapat, diberi label 2,4, D 100 ppm (100 ml) dan disimpan di refrigerator.

Pembuatan larutan stok ZPT BAP 100 ppm dilakukan dengan menimbang BAP (Phyto tech. Lab) sebanyak 10 mg menggunakan neraca analitik (Boeco, Germany), dimasukkan pada erlenmeyer, ditambahkan 10 tetes HCL 1N dan dipanaskan, ditambah H₂O 20 ml sambil terus diaduk dan dipanaskan. Kemudian ditambah aquadest sampai 100 ml dan diaduk sampai homogen. Larutan stok dituang pada botol kaca 200 ml dan ditutup dengan rapat, diberi label BAP 100 ppm (100 ml) dan disimpan di refrigerator.

Pembuatan larutan stok fenilalanin 1000 ppm dilakukan dengan menimbang 10 mg fenilalanin menggunakan neraca analitik (Boeco, Germany), dimasukkan pada erlenmeyer, dilarutkan pada 10 ml aquadest sambil terus diaduk. Kemudian larutan stok disaring dengan kertas saring Whatman (Whatman International Ltd., England) no. 42 pada botol kaca 100 ml, ditutup dengan rapat, diberi label PHE 1000 ppm dan disimpan dalam refrigerator [14]. Stok asam salisilat dibuat dengan cara yang sama dan diberi label SA 1000 ppm serta disterilisasi dengan *autoclave* selama 20 menit pada suhu 121°C tekanan 1,5 atm

Medium yang digunakan untuk induksi kalus adalah medium MS (Murashige and Skoog) padat dengan penambahan ZPT berupa 2,4 D dan BAP [15]. Pembuatan medium MS padat 1 L dilakukan dengan cara erlenmeyer 1000 ml berisi 500 ml aquades, ditambahkan masing – masing stok A dan B 20 ml, stok C dan D 10 ml, stok E dan F 5 ml, stok vitamin 1 ml, stok myoinositol 10 ml, ZPT 2,4 D 5 ml (0,5 ppm), BAP 10 ml (1 ppm), 30 gram sukrosa dan diaduk sampai homogen. Kemudian ditambah aquadest sampai 1000 ml dan pH di ukur sebesar 6 menggunakan kertas pH lalu ditambahkan 8 gram agar- agar diaduk dan dipanaskan. Setelah itu dituang dalam botol kultur steril dan disterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C tekanan 1,5 atm selama 30 menit setelah dingin medium dikeluarkan dan disimpan di rak kultur. Pemberian ZPT 2,4 D 0,5 ppm dan BAP 1 ppm

Sterilisasi

Sterilisasi peralatan kultur seperti botol kultur, pinset, scalpel, cawan petri, dan botol dicuci bersih dan dikeringkan. Pinset, scalpel, gunting, cawan Petri dan pipet dibungkus dengan kertas. Sedangkan botol kultur di rendam dengan sodium hipoklorit 20% (v/v) selama 1 hari, dan dikeringkan. Botol ditutup plastik dan diikat dengan karet. Semua peralatan kultur dan botol kultur di *autoclave* pada suhu 121°C dengan tekanan 1,5 atm selama 60 menit setelah dingin peralatan kultur yang steril dikeluarkan dan disimpan pada rak kultur.

Sterilisasi ruang kerja (*Laminar Air Flow*) dengan cara lampu UV dinyalakan dan dibiarkan selama 2 jam kemudian dimatikan, blower dan lampu neon dinyalakan selama 30 menit dan ruang kerja siap digunakan. Sebelum proses inokulasi eksplan dilakukan, meja kerja terlebih dahulu dibersihkan dengan alkohol 70% dan dilap dengan tissue [15].

Sterilisasi eksplan dilakukan dengan metode [16]. Biji *M.*

oleifera yang telah masak dicuci dengan detergen selama 15 menit, dicuci dengan air mengalir kemudian biji direndam dengan fungisida 1;10 selama 15 menit, dan dicuci dengan air mengalir, dilanjutkan sterilisasi di LAF menggunakan NaOCl 3 % selama 30 menit dan dicuci dengan aquades steril 2 kali. Kemudian biji direndam dengan Alkohol 96% selama 5 menit. Selanjutnya biji dibakar sebanyak 3 kali dan kulit biji dibuang. Biji dipotong menjadi 3 bagian dan ditanam pada media induksi kalus.

Inokulasi eksplan

Inokulasi eksplan dilakukan di LAF (*Laminar Air Flow*). Eksplan steril diinokulasikan pada media induksi kalus dengan tambahan ZPT 2,4 D 0,5 ppm dan BAP 1. Eksplan diinkubasi pada suhu $25 \pm 2^{\circ} \text{C}$ [17] kondisi gelap dan dilakukan sub kultur setiap tiga minggu sekali pada medium yang sama [18].

Perlakuan dengan elisitor dan prekursor feeding

Pembuatan medium MS cair perlakuan yang di SA (asam salisilat) dan Phe (fenilalanin) sama dengan pembuatan medium padat tanpa penambahan agar. Kultur suspensi sel dilakukan dengan inokulasi kalus sebanyak 200-300 mg di botol steril 250 ml yang berisi 100 ml medium MS cair kemudian dinkubasi dengan *rotary shaker* kecepatan 120 rpm. Pada suhu $25^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ} \text{C}$. Setelah 14 hari, medium ditambah asam salisilat 0 ; 0,5; 1; 1,5 ppm untuk perlakuan elisitor dan fenilalanin 0; 5; 10; 15 ppm untuk perlakuan prekursor *feeding* [19] dan dinkubasi dengan *rotary shaker* selama 5 hari kecepatan 120 rpm. Kondisi inkubasi kultur yaitu pada suhu $25^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ} \text{C}$.

Setelah pemberian perlakuan elisitor dan prekursor *feeding* selama 5 hari maka kultur suspensi sel dipanen dengan cara medium kultur suspensi sel disaring menggunakan kertas saring Whatman no. 42. Sel dan kalus yang tertampung ditimbang menggunakan neraca digital steril untuk proses ekstraksi fenol dan perhitungan berat kering.

Ekstraksi total asam fenol

Proses ekstraksi dilakukan dengan metode [20] yaitu kultur suspensi sel disaring menggunakan kertas saring Whatman (*Whatman International Ltd., England*) no. 42 dan ditimbang sebanyak 100 mg dengan neraca digital, dihaluskan dengan mortar, dicampur 10 ml ethanol 100 % dan 5 ml 0,1 % HCl kemudian divortex dengan kecepatan 2500 rpm selama 10 menit. Selanjutnya didiamkan pada *rotary shaker* selama 30 menit untuk proses maserasi. Campuran ekstrak dan solvent disentrifugasi selama 20 menit dengan kecepatan 2500 rpm dan supernatan diambil untuk diukur kandungan fenol intraselularnya.

Kuantifikasi menggunakan spektrofotometri UV-Vis

Konsentrasi total asam fenol diukur menggunakan teknik Folin Ciocalteu [20]. Supernatan yang diperoleh dari proses ekstraksi diambil sebanyak 1 ml ditambah dengan 2 tetes reagen Folin Ciocalteu, 1 ml Sodium karbonat 15% (w/v). Setelah 1 jam, sampel diukur absorbansinya pada panjang gelombang 760 nm [21] menggunakan spektrofotometer UV VIS (Genesys USA). Kurva standar asam fenol

menggunakan asam tanat sebagai standar dan diplot antara konsentrasi 0,03, 0,05, 0,07 dan 0,09 ppm [22].

Penghitungan berat kering sel

Kalus/sel yang masih tertampung di kertas saring ditimbang dan dioven pada suhu 80°C selama 1 hari. Setelah kering, kalus ditimbang di neraca *analytical balance*.

C. Analisis data

Rancangan penelitian yang digunakan adalah RAL (rancangan acak lengkap) dengan ulangan sebanyak 3 kali. Parameter pengamatan adalah konsentrasi total asam fenol dan berat kering sel pada perlakuan asam salisilat dan fenilalanin. Data yang diperoleh dari hasil penelitian akan dianalisis secara statistik menggunakan ANOVA one-Way dan uji Tukey dengan taraf kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$).

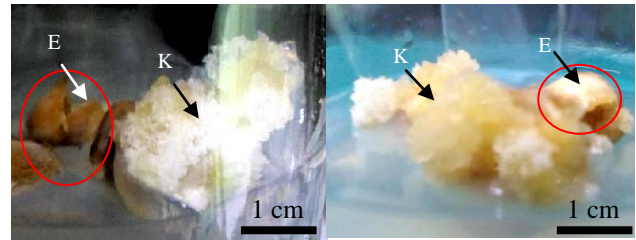
III. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil induksi kalus eksplan biji *M. oleifera* Lam.

Hasil induksi kalus biji *M. oleifera* pada medium MS dengan kombinasi ZPT 0,5 ppm 2,4 D dan 1ppm BAP menghasilkan kalus remah berwarna putih kekuningan, dan tumbuh setelah berumur 10 hari inokulasi. Respon pertama pada eksplan biji adalah terjadinya pembengkakan dan munculnya massa sel (kalus) pada bagian di sekitar irisan luka eksplan (Gambar 1). Hal ini sejalan dengan pernyataan [23], bahwa kalus akan tumbuh pada bagian tepi eksplan dan setelah waktu tertentu kalus akan memenuhi seluruh permukaan eksplan.

Komposisi konsentrasi ZPT yang digunakan adalah 1 ppm BAP dan 0,5 ppm 2,4 D karena bertujuan untuk pembentukan kalus yang terus menerus sebagai sumber inokulum untuk kultur suspensi sel. Berdasarkan [24] bahwa ratio konsentrasi sitokinin dan auksin intermediet akan menginduksi pembentukan kalus. Hasil penelitian yang telah dilakukan oleh [16] pada kotiledon biji *M. oleifera* juga menunjukkan peningkatan berat kalus yang signifikan pada perlakuan 0,5 mg/l BAP dan 1 mg/l 2,4 D.

Kalus yang dihasilkan merupakan kalus dengan tekstur remah dan berwarna putih. Adanya warna dan tekstur pada kalus dapat dipengaruhi oleh cahaya, ZPT dan asal eksplan. Kalus yang berwarna putih kekuningan merupakan kalus embriogenik [25] yang terbentuk karena hasil aktivitas pembelahan sel yang meningkat [26]. Hasil ini sejalan dengan penelitian [16] pada induksi kalus kotiledon biji *M. oleifera* perlakuan 0,5 mg/l BAP dan 1 mg/l 2,4 D menghasilkan kalus remah berwarna putih. Hasil induksi kalus umbi iles-iles dengan kombinasi yang seimbang 1 mg/l 2,4-D + 1 mg/l BAP juga menghasilkan kalus berwarna putih [27].

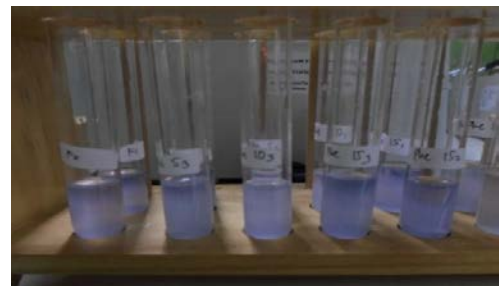


Gambar 1. Hasil Induksi Kalus Eksplan Biji *M. oleifera* Pada Medium MS 0,5 ppm 2,4 D dan 1 ppm BAP (Keterangan: K : kalus, E: eksplan)

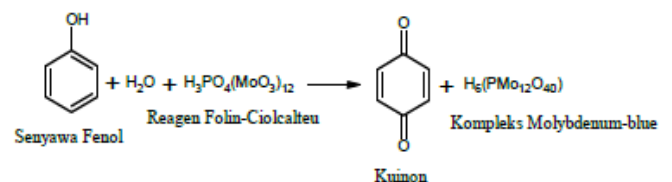
B. Uji kualitatif keberadaan senyawa fenol

Kalus yang dihasilkan dari proses induksi kalus biji *M. oleifera* kemudian digunakan untuk proses kultur suspensi sel. Setelah kalus diinokulasikan pada medium cair dan diagitasi maka akan terbentuk remahan sel yang terdispersi dalam medium. Kultur suspensi sel dapat digunakan untuk proses peningkatan senyawa metabolit sekunder dengan dengan penambahan elisitor [20] dan penambahan prekursor *feeding* [11].

Hasil kultur suspensi sel yang telah diberi perlakuan asam salisilat dan fenilalanin kemudian diekstraksi menggunakan etanol dan menghasilkan ekstrak senyawa total fenol yang tidak berwarna (bening). Ekstrak kalus dari variasi konsentrasi perlakuan prekursor dan elisitor setelah diberi reagen Folin-Ciocalteu menghasilkan warna biru kromogen (Gambar 2). Warna biru kromogen merupakan hasil reaksi antara reagen Folin – Ciocalteu yang mengoksidasi gugus hidroksil (OH) dalam keadaan basa. Pada Gambar 3 memaparkan mekanisme reaksi antara senyawa fenol yang dapat direduksi oleh reagen Folin-Ciocalteu membentuk kompleks molybdenum yang berwarna biru [28].



Gambar 2 Hasil Reaksi Senyawa Fenol Dengan Reagen Folin-Ciocalteu Yang Menghasilkan Warna Biru.



Gambar 3 Reaksi Senyawa Fenol Dengan Reagen Folin-Ciocalteu [29]

C. Pengaruh asam salisilat pada kultur suspensi sel *M. oleifera* Lam.

Hasil uji Anova One Way $p \leq 0,092$ ($p \leq 0,05$) menunjukkan bahwa variasi konsentrasi asam salisilat tidak berpengaruh terhadap konsentrasi total asam fenol. Hal ini dapat dikarenakan adanya beberapa faktor yaitu range konsentrasi

asam salisilat yang digunakan terlalu rendah yaitu 0,5 – 1,5 ppm. Selain itu, optimasi elisitor pada kultur suspensi sel bergantung pada spesifitas, konsentrasi, waktu elisitasi, dan spesies tanaman sehingga produk yang diakumulasi oleh setiap tanaman hasil elisitasi berbeda [30].

Penghitungan konsentrasi total asam fenol dengan menggunakan persamaan regresi kurva standar asam tanat $y=4,091x-0,001$. Berdasarkan Tabel 1 diketahui bahwa perlakuan elisitor asam salisilat dari konsentrasi 0,5-1,5 ppm menunjukkan peningkatan kandungan senyawa total asam fenol dan penurunan berat kering sel dibandingkan kontrol. Konsentrasi total asam fenol tertinggi terdapat pada perlakuan elisitor asam salisilat konsentrasi 1 ppm yaitu $1,6067 \pm 0,458$ ppm dan konsentrasi terendah terdapat pada kontrol 0 ppm yaitu $0,6304 \pm 0,148$ ppm. Berat kering tertinggi terdapat pada perlakuan kontrol 0 ppm yaitu $25,1 \pm 2,42$ mg sedangkan berat kering terendah terdapat pada perlakuan 1,5 ppm yaitu $7,7 \pm 1,35$ mg.

Tabel 1
Konsentrasi Total Asam Fenol dan Berat Kering Sel *M. oleifera* Pada Perlakuan Elisitor Asam Salisilat

Perlakuan	total asam fenol (ppm)	Berat kering sel (mg)
0 ppm	$0,6304 \pm 0,148$	$25,1 \pm 2,42$
0,5 ppm	$1,3613 \pm 0,413$	$10,0 \pm 0,95$
1 ppm	$1,6067 \pm 0,458$	$12,5 \pm 1,85$
1,5 ppm	$1,2399 \pm 0,211$	$7,7 \pm 1,35$

Konsentrasi 1 ppm asam salisilat terjadi peningkatan senyawa total asam fenol $1,6067 \pm 0,458$ ppm akan tetapi terjadi penurunan berat kering sel $12,5 \pm 1,85$ mg dibandingkan kontrol yaitu $0,6304 \pm 0,148$ untuk total asam fenol dan $25,1 \pm 2,42$ mg berat kering sel. Peningkatan senyawa total total asam fenol dan penurunan berat kering ini terjadi merupakan salah satu respon tumbuhan ketika berada dalam kondisi tercekam untuk proses pertahanan diri, sehingga tumbuhan lebih banyak menghasilkan metabolit sekunder dibandingkan pertumbuhan. Hal ini sesuai dengan pernyataan [31] bahwa salah satu senyawa yang berperan dalam mekanisme pertahanan tumbuhan adalah senyawa golongan fenol. Peningkatan fenol pada perlakuan elisitor asam salisilat diduga karena adanya peningkatan ROS (*Reactive oxygen species*) yang merupakan respon awal pemberian elisitor asam salisilat [31]. Selain itu, asam salisilat juga mempengaruhi pembentukan enzim PAL (*Phenylalanine Ammonia Lyase*) yang berperan dalam jalur fenilpropanoid dan beberapa enzim yang berperan untuk menstabilkan ROS seperti peroksidase dan SOD (*superoxide dismutase*) [32].

Adanya peningkatan ROS (*Reactive Oxygen Species*) yang sejalan dengan peningkatan konsentrasi asam salisilat dapat menyebabkan terjadinya penurunan pertumbuhan sel. Menurut [31] meningkatnya kadar ROS pada sel dapat menyebabkan pengikatan langsung enzim katalase maupun makromolekul lain seperti protein dan lipid. Sehingga penumpukan ROS yang berlebihan dapat menyebabkan kerusakan oksidatif dan kematian sel. Selain itu, asam salisilat juga berpengaruh pada peningkatan hormon ABA (asam absisat) yang berfungsi dalam proses pertahanan terhadap cekaman abiotik dan dormansi. Hal ini dapat diduga bahwa dengan peningkatan ABA dapat menyebabkan penurunan pertumbuhan sel karena

sel lebih banyak memproduksi senyawa pertahanan seperti fenol [33]. Hasil penelitian [31] menunjukkan bahwa pada konsentrasi 3,125–12,5 mg/L menunjukkan penurunan berat kering dan peningkatan senyawa fenol pada kultur sel *S. Miltiorrhiza*. Pada tanaman *Vitis vinifera* pemberian metil asam salisilat 50 μ M terjadi penurunan berat kering $16,4 \pm 0,5$ g/l dibandingkan kontrol $17,6 \pm 0,9$ g/l dan kandungan senyawa fenol sebanyak 790 ± 30 mg/l dibandingkan kontrol 760 ± 60 mg/l setelah sepuluh hari masa inkubasi [20]. Sedangkan pada tanaman Chickpea (*Cicer arietinum* L.) penambahan asam salisilat 1,5 mM dapat meningkatkan kandungan fenol < 60 μ g setelah 96 jam masa inkubasi [32].

D. Pengaruh fenilalanin pada kultur suspensi sel *M. oleifera* Lam.

Hasil uji Anova one way, $p \leq 0,010$ ($p \leq 0,05$) menunjukkan bahwa variasi konsentrasi fenilalanin berpengaruh terhadap kandungan total asam fenol. Penghitungan konsentrasi total asam fenol dengan menggunakan persamaan regresi kurva standar asam tanat $y=4,091x-0,001$. Pada kultur suspensi sel *M. oleifera* prekursor *feeding* yang digunakan adalah fenilalanin dengan konsentrasi 0 ppm (kontrol), 5 ppm, 10 ppm dan 15 ppm.

Tabel 2
Konsentrasi Total Asam Fenol dan Berat Kering Sel *M. oleifera* Pada Perlakuan Prekursor *Feeding* Fenilalanin

Perlakuan	total asam fenol (ppm)	Berat kering sel (mg)
0 ppm	$0,63^a \pm 0,15$	$6,9 \pm 0,80$
5 ppm	$1,60^b \pm 0,37$	$7,3 \pm 0,61$
10 ppm	$1,26^{ab} \pm 0,31$	$7,8 \pm 0,72$
15 ppm	$1,52^b \pm 0,29$	$9,7 \pm 1,46$

Keterangan: Hasil uji Tukey menunjukkan perbedaan huruf pada kolom yang sama berbeda signifikan ($p \leq 0,05$)

Berdasarkan Tabel 2, diketahui bahwa perlakuan prekursor *feeding* fenilalanin dari konsentrasi 0-15 ppm menunjukkan peningkatan berat kering dan total asam fenol dibandingkan dengan kontrol. Berat kering tertinggi terdapat pada perlakuan prekursor *feeding* fenilalanin konsentrasi 15 ppm yaitu $9,7 \pm 1,46$ mg dan konsentrasi terendah terdapat pada kontrol 0 ppm yaitu $6,9 \pm 0,80$ mg. Konsentrasi fenol tertinggi terdapat pada perlakuan prekursor *feeding* fenilalanin konsentrasi 5 ppm yaitu $1,60 \pm 0,37$ ppm dan konsentrasi terendah terdapat pada kontrol 0 ppm yaitu $0,63 \pm 0,15$ ppm. Peningkatan berat kering sel dikarenakan penambahan asam amino eksogen seperti fenilalanin. Hal ini sesuai dengan pernyataan [34] yang menyatakan penambahan fenilalanin pada medium kultur suspensi sel dapat meningkatkan kandungan fenilalanin endogen. Sehingga kelebihan jumlah karbon yang dapat digunakan untuk proses pertumbuhan [35].

Peningkatan total asam fenol karena fenilalanin merupakan prekursor utama dalam proses biosintesis senyawa fenol. Sehingga semakin banyak fenilalanin yang diserap maka semakin banyak pula senyawa total fenol yang dihasilkan. Hal ini sejalan dengan pernyataan [36] bahwa penambahan fenilalanin berpengaruh terhadap kandungan senyawa total asam fenol karena fenilalanin merupakan prekursor utama dalam proses metabolisme melalui jalur phenilpropanoid, sehingga peningkatan jumlah fenilalanin yang diserap akan

meningkatkan penghasilan enzim PAL yang berpengaruh pada proses pembentukan asam fenol. Enzim PAL (*phenylalanine ammonia lyase*) merupakan enzim kunci dalam proses biosintesis senyawa fenol dari asam amino fenilalanin [31]. Hasil penelitian [19] pada tanaman *Mentha arvensis* menunjukkan penambahan fenilalanin konsentrasi 5 ppm mampu meningkatkan kandungan senyawa fenol $8,02 \pm 1,08$ mg/g dibandingkan kontrol yaitu $6,24 \pm 0,68$ mg/g dan meningkatkan berat basah kalus 0,30 gram dibandingkan kontrol yaitu 0,26 gram.

Konsentrasi fenilalanin 5 dan 15 ppm berpengaruh signifikan terhadap proses produksi senyawa total asam fenol pada kultur suspensi sel *M. oleifera* dibandingkan dengan kontrol. Peningkatan senyawa metabolit sekunder seperti senyawa asam fenol dapat dikarenakan adanya peningkatan enzim PAL yang termasuk enzim kunci sebelum memasuki jalur asam sinamat [19]. Pada perlakuan fenilalanin konsentrasi 10 ppm terjadi penurunan senyawa fenol tetapi terjadi peningkatan berat kering sel. Hal ini dikarenakan pada proses kultur suspensi sel, kalus *M. oleifera* tidak terpencah secara sempurna sehingga luas permukaan sel yang kontak dengan medium juga lebih kecil. Hal ini menunjukkan bahwa ukuran sel mempengaruhi tingkat penyerapan nutrisi di medium tumbuh. Berdasarkan [37] menyebutkan bahwa ukuran sel memiliki pengaruh terhadap tingkat penyerapan nutrisi, dimana ukuran sel yang lebih kecil memiliki kemampuan menyerap nutrisi lebih cepat dibandingkan sel yang berukuran lebih besar. Hal ini telah dibuktikan oleh [37] dengan mempelajari morfologi dan variasi ukuran sel fitoplankton dan menyimpulkan bahwa tingkat *sinking* atau penyerapan gizi yang baik terbatas pada ukuran sel $< 20 \mu\text{m}$.

IV. KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian dapat disimpulkan bahwa variasi perlakuan konsentrasi asam salisilat dan fenilalanin berpengaruh terhadap peningkatan kandungan total asam fenol pada kultur suspensi sel *M. oleifera* Lam. total asam fenol tertinggi pada perlakuan asam salisilat konsentrasi 1 ppm $1,6067 \pm 0,458$ ppm dibandingkan kontrol yaitu $0,6304 \pm 0,148$ ppm dan perlakuan fenilalanin konsentrasi 5 ppm $1,60 \pm 0,37$ ppm dibandingkan kontrol yaitu $0,63 \pm 0,15$ ppm.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis Y.P mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Republik Indonesia yang telah memberikan dukungan finansial melalui Beasiswa Bidik Misi tahun 2011-2015.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] H.S.U. Rebecca, M.Sharon, A. Arbainsyah dan D. Lucienne, "*Moringa Oleifera: Medicinal And Socio-Economic Uses*". International Course On Economic Botany. National Herbarium Leiden, Netherlands (2006)
- [2] A.W. Barselia, M. Yasir, E. H. Prameisti, Y. Permanasari, H. L. Rizkia, Ni Luh P. S. Dewi, D. R. Sinaga, W. Busse, S. Ulbricht, M. P. Koentjoro, dan E. N. Prasetyo, "Study Analysis Of Developing *Moringa oleifera* As Potential Comodity In Poteran Island, Madura Indonesia", Proceeding Of 9th International Conference On Marine Technology (Martec). Surabaya, 24-26 Oktober (2014). Surabaya: Its Press
- [3] F.Luthfiyah, "Potensi Gizi Daun *Moringa Oleifera* (*Moringa Oleifera*) Nusa Tenggara Barat". *Media Bina Ilmiah*, 6 (2) (2012): 42-50
- [4] A.D. Krisnadi, *Kelor Super Nutrisi*. Biora: Kelorina.Com (2012).
- [5] J.Coppin, *A Study Of The Nutritional And Medicinal Values Of Moringa oleifera Leaves From Sub-Saharan Africa: Ghana, Rwanda Senegal And Zambia*. Graduate School-New Brunswick Rutgers, The State University Of New Jersey (2012).
- [6] D.Maulidina, dan N. Zulkarnaen.. "Ekstraksi Antioksidan (Likopen) Dari Buah Tomat Dengan Menggunakan Solven Campuran N - Heksana, Aseton, Dan Etanol". *Skripsi*. Semarang : Jurusan Teknik Kimia Fakultas Teknik Universitas Diponegoro (2010).
- [7] C.Santos-Buelga, dan A. Scalbert, "Proanthocyanidins And Tannin-Like Compounds Nature, Occurrence, Dietary Intake And Effects On Nutrition And Health" *J. Sci. Food Agric*, 80 (2000): 1094-1117.
- [8] H.Riedel, Divine N. A., Nay M.M.T.S., Onur K., Peter N., dan Iryna S, "Elicitation And Precursor Feeding Influence Fenolic Acids Composition In *Vitis vinifera* Suspension Culture". *African Journal Of Biotechnology* 1(12) (2012) :3000-3008.
- [9] R.F.Guerrero,Garcia-Parrilla M.C., Puertas B, dan Cantos-Villar E, "Wine, Resveratrol And Health: A Review ". *Nat. Prod. Commun.* 4(5) (2009): 635-58.
- [10] I.Raskin, Ribnicki D.M., Komarnytsky S., Ilic N., Poulev A., Borisjuk N., Brinker A., Moreno Da, Ripoll C., Yakoby N., O'neal J.M., Cornwell T., Pastor I,dan Fridlender B. "Plants And Human Health In The Twenty-First Century", *Trends Biotechnol.*, 20 (12) (2002): 522-531.
- [11] I.Smetanska, "Production Of Secondary Metabolites Using Plant Cell Cultures". *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 111(2008): 187-228.
- [12] M. Sharma,, A. Sharma, A. Kumar dan S. K. Basu, "Enhancement Of Secondary Metabolites In Culture Plant Cells Through Stress Stimulus". *American Journal Of Plant Physiology* 6 (2011): 50-71
- [13] A.N. Shinde, Malpathak N., dan Fulzele D.P. "Enhanced Production Of Phytoestrogenic Isoflavones From Hairy Root Cultures Of *Psoralea Corylifolia* L. Using Elicitation And Precursor Feeding". *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 14 (2009): 288-294.
- [14] M. Masoumian, A. Arbakariya, A. Syahda, dan M. Maziah. "Effect Of Precursors On Flavonoid Production By *Hydrocotyle bonariensis* Callus Tissues". *African Journal Of Biotechnology* 10 (32) (2011) :6021-6029.
- [15] D.E. Evands., J.O.D. Coleman dan A. Kearns. *Plant cell culture*. London: Bios scientific publisher (2003)
- [16] C. N Mylene. dan Evalour T. A. "Callus Induction In Cotyledons Of *Moringa Oleifera* Lam." *Philipp Agric Scientist* 94(3) (2011): 239-247.
- [17] M. Mathur dan R. Kamal. "Studies On Trigonelline From *Moringa Oleifera* And Its In Vitro Regulation By Feeding Precursor In Cell Cultures". *Journal Of Pharmacognosy* 22(5) (2012):. 994-1001.
- [18] P.S Lalida. "Peroxidase Activity In Native And Callus Culture Of *Moringa Oleifera* Lam." *Journal Of Medical And Bioengineering* 2(3) (2013).
- [19] D. Roy, dan S. Mukhodhyay." Enhances Rosminic Acid Production In Cultured Plants Of Two Species Of *Mentha*". *Indian Journal Of Experimental Biology*, 50 (2012): 817-825
- [20] T.V. Vuong, C. Franca, dan W. Zhang. "Treatment Strategies For High Resveratrol Induction In *Vitis vinifera* Cell Suspension Culture". *Biotechnology Reports* 1(2) (2014) :15-21
- [21] P. Cunnif, "Official Method Of Analysis Of AOAC International Sixteenth Edition Vol II" Published By AOAC International Suite 500, 481 North Frederick Avenue Gaithersburg (1996): Maryland 20877-2417 USA
- [22] D.Andryani, P. I. Utami, Dan B.A. Dhiani. "Penetapan Kadar Tanin Daun Rambutan (*Nephelium Lappaceum* L.) Secara Spektrofotometri Ultraviolet Visible". *Pharmacy* 07 (2) (2010):1-11
- [23] Puspitasari, A., dan C, J, Soegihardjo. "Optimisasi Media Pertumbuhan Kalus Sebagai Langkah Awal Upaya Budidaya In Vitro Tanaman *Vitex trifolia* L." *Majalah Farmasi Indonesia* 13 (1)(2002):21-25.
- [24] F, Skoog dan C.O. Miller, "Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro". *Symp. Soc. Exp. Biol.* 11 (1957):118-130.
- [25] G. Peterson dan R. Smith, " Effect Of Abscid Acid And Callus Size On Regeneration Of American And International Rice Varieties," *Plant Cell Rep* (10) (1991):35-38.
- [26] R.L.M. Pierik, "*In Vitro Culture Og Higher Plant*". Martinus Nijhoff Publisher: Netherland (1987)

- [27] M. M. Aziz, E. Ratnasari, dan Y. S. Rahayu. "Induksi Kalus Umbi Iles-Iles (*Amorphophallus muelleri*) dengan Kombinasi Konsentrasi 2,4-D dan BAP Secara In Vitro". *Lentera Bio* 3(2) (2014):114
- [28] A.P. Jadhav, J.A. Kareparamban, P.H. Nikam dan V.J. Kadam. "Spectrophotometric Estimation Of Ferulic Acid From *Ferula asafoetida* By Folin- Ciocalteu Reagent". *Der Pharmacia Sinica* 3 (6) (2012): 680:684
- [29] R. Hardiana, Rudiyanayah, dan T. A. Zaharah. "Aktivitas Antioksidan Senyawa Golongan Fenol Dari Beberapa Jenis Tumbuhan Famili Malvaceae." *JKK* 1 (1) (2012): 8-13
- [30] H. Patel dan R. Krishnamurthy. "Elicitors In Plant Tissue Culture", *Journal Of Pharmacognosy And Phytochemistry*, 2 (2)(2013):817-825.
- [31] J. Dong, G. Wan, dan Z. Liang. "Accumulation Of Salicylic Acid Induced Phenolic Compounds And Raised Activities Of Secondary Metabolic And Antioxydative Enzymes In *Salvia miltiorrhiza* Cell Culture". *Journal Of Biotechnology* 148 (2010): 99-104
- [32] A.R. War, M.G. Paulraj, M. Y. War dan S. Ignacimuthu. "Role Of Salicylic Acid In Induction Of Plant Defense System In Chickpea (*Cicer arietinum* L.)". *Plant Signaling And Behavior* 6(11)(2011) : 1787- 1792
- [33] M. Hara, J. Furukawa, A. Sato, T. Mizoguchi, dan K. Miura. "Abiotic Stress and Role of Salicylic Acid in Plants". P. Ahmad dan M.N.V. Prasad (eds.) *Abiotic Stress Responses in Plants: Metabolism, Productivity and Sustainability*. Springer Science Business Media (2012).
- [34] J. Kovačik, I. Kron, M. Repčák dan M. Bac̣kor. "Effect of feeding precursors on phenylalanine ammonia-lyase activity and coumarin accumulation in leaves of *Matricaria chamomilla* L". *Plant Growth Regul* 52 (2007):9-15
- [35] Tissurat B. dan Berhow M. "Carbon Levels Influence Rosmarinic Acid Levels In Tissue Cultures Of *Mentha spicata* L." *Phytochemical Society Of North America Meeting And Newsletter* (2003)
- [36] J. Kovačik, Klejduš B, Bac̣kor M, dan Repčák M. "Phenylalanine ammonia-lyase activity and phenolic compounds accumulation in nitrogen-deficient *Matricaria chamomilla* leaf rosettes". *Plant Sci* 172 (2007):393-399
- [37] Munk Dan Riley (1952) *Dalam* Friabele, E.S., D.L Correl, Dan M.A Faust. "Relationship Between Phytoplankton Cell Size And The Rate Of Orthophosphate Uptake: Insituobservation Of An Estuarine Population". *Marine Biology* 45 (1978): 39-52