

Vol.11 No. 02 Desember 2014

ISSN 1693-3591

# PHARMACY

JURNAL FARMASI INDONESIA  
Pharmaceutical Journal of Indonesia

## PHARMACY

Penanggung jawab : Dekan Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah  
Purwokerto

Mitra Bestari : Prof. Dr. Djoko Wahyono, S.U., Apt.

Dr. Tjiptasurasa, S.U., Apt.

Dr. Sabikis, Apt.

Dewan Penyunting : Dr. Asmiyenti Djaliasrin Djalil, M.Si. (Ketua)

Dr. Nunuk Aries Nurulita., M.Si., Apt.

Suparman, M.Sc., Apt.

Binar Asrining Dhiani, M.Sc., Apt.

Githa Fungie Galistiani, M.Sc., Apt.

Dwi Hartanti., M.Si., Apt

Distributor : Rochmadi Budi S., A. Md.

Penerbit : Fakultas Farmasi

Universitas Muhammadiyah Purwokerto

Alamat : Fakultas Farmasi

Universitas Muhammadiyah Purwokerto

Jalan Raya Dukuwaluh Purwokerto 53182

PO.BOX. 202

Telp. (0281) 636751;630463 Fax. (0281) 637239.

E-mail: [jurnal.pharmacy@yahoo.co.id](mailto:jurnal.pharmacy@yahoo.co.id)

## DAFTAR ISI

DAFTAR ISI	ii
<b>PERAN PENGAWAS MINUM OBAT SEBAGAI INDIKATOR KEBERHASILAN PENGOBATAN TB PADA PASIEN KO-INFeksi TB-HIV DI RSUD DOK II JAYAPURA PERIODE JANUARI 2011- SEPTEMBER 2012</b> Elfride Irawati, Eva Susanty Simaremare, Rusnaeni	108-116
<b>PENGARUH ELISITOR BIOTIK DAN ABIOTIK PADA PRODUKSI FLAVONOID MELALUI KULTUR JARINGAN TANAMAN</b> Indah Yulia Ningsih	117-132
<b>ISOLASI SENYAWA FENOLIK DARI FRAKSI SEMIPOLAR EKSTRAK DAUN <i>Aglaiia speciosa</i></b> Adia Putra Wirman, Lucy Efrieni, Yunazar Manjang, Rizal Fahmi	133-141
<b>FORMULASI <i>HARD MOLDED LOZENGES</i> EKSTRAK KELOPAK BUNGA ROSELLA (<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.) DENGAN PENAMBAHAN KOMBINASI <i>CORN SYRUP</i> DAN MANITOL</b> Kori Yati, Rahmah Elfiyani, Dessy Ayu Permatasari	142-156
<b>KORELASI PENGUKURAN ANTROPOMETRI TERHADAP KADAR TRIGLISERIDA PADA DEWASA MUDA</b> Bernahdea Wikan Pangesti, Diah Intan Sari, Fenty	157-165
<b>POTENSI BIJI SAGA (<i>Abrus precatorius</i>) SEBAGAI KONTRASEPSI PRIA</b> Siti Muslichah, Wiratmo, Diana Holiday, Fifteen Aprilia Fajrin	166-180
<b>AKTIVITAS FAGOSITOSIS MAKROFAG DARI FRAKSI N-HEKSAN HERBA SAMBILOTO (<i>Andrographis paniculata</i>, (Burm.F) Nees) TERHADAP MENCIT YANG DIINDUKSI VAKSIN HEPATITIS B</b> Mamik Ponco Rahayu	181-199
<b>MEMBRAN KOMPOSIT CA-PS PEMISAH LIMBAH BATIK (<i>RHODAMINE B</i>) DENGAN "<i>DEAD-END</i>" MEMBRANE REACTOR</b> Rizka Ayusnika, Hendra Gunawan, Ismawati, Muhammad Wisnu Nugroho, Rizki Nur Apriliani, Senny Widyaningsih	200-213
<b>AKTIVITAS ANTIMIKROBA EKSTRAK BIJI <i>Nigella sativa</i> TERHADAP VIABILITAS BAKTERI PROBIOTIK SECARA <i>IN VITRO</i> DAN <i>IN VIVO</i></b> Ahmad Shobrun Jamil, Buhari Adi, Bayu Prasaja, Astri Ariani, Zulkipli Hardi	214-228

**PENGARUH MEDIUM DISSOLUSI DAN PENGGUNAAN *SINKER* TERHADAP PROFIL DISOLUSI TABLET *FLOATING* ASPIRIN** 229-241

Agus Siswanto, Achmad Fudholi, Akhmad Kharis Nugroho, Sudibyo Martono

PERAN PENGAWAS FARMASI  
JERAMBA INDIKATOR KEMAMPUAN PENGUNCIAN  
PADA PASIEN ED-INSERSI TB - HIV DISKUSI DOKTER JALAPURA  
PERIODE JANUARI 2011-SEPTEMBER 2012

ONTO TAXIN SUPERIOR AS AN INDICATOR FOR *FLOATING* TABLET AT  
RSDI DOK II JALAPURA PERIODE JANUARI 2011-SEPTEMBER 2012

Agus Siswanto, Achmad Fudholi, Akhmad Kharis Nugroho, Sudibyo Martono

Program Studi Farmasi, Jurusan Sains, Fakultas IPA,  
Universitas Cenderawasih, Jayapura  
Jalan Komplek Perumahan 1, Wamena, Jayapura 99311  
E-mail: fudholi@unsw.ac.id (Akhmad Kharis Nugroho)

**ABSTRAK**

Abstrak yang membahas pengaruh medium disolusi dan penggunaan sinker terhadap profil disolusi tablet floating aspirin. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh medium disolusi (air suling, air suling dengan pemanasan, air suling dengan pemanasan dan penambahan sinker) terhadap profil disolusi tablet floating aspirin. Penelitian ini menggunakan metode uji disolusi dengan alat uji disolusi tipe 2. Hasil penelitian menunjukkan bahwa penggunaan medium disolusi yang berbeda-beda berpengaruh signifikan terhadap profil disolusi tablet floating aspirin. Penggunaan medium disolusi dengan pemanasan dan penambahan sinker menghasilkan profil disolusi yang lebih baik dibandingkan dengan medium disolusi lainnya.

**ABSTRACT**

Abstract discussing the influence of dissolution medium and the use of sinker on the dissolution profile of floating aspirin tablets. This study aims to determine the effect of different dissolution media (sterilized water, sterilized water with heating, sterilized water with heating and addition of sinker) on the dissolution profile of floating aspirin tablets. The study uses a dissolution test method with a dissolution apparatus type 2. The research results show that the use of different dissolution media significantly affects the dissolution profile of floating aspirin tablets. The use of dissolution media with heating and addition of sinker produces a better dissolution profile compared to other media.

**PENGARUH ELISITOR BIOTIK DAN ABIOTIK PADA PRODUKSI FLAVONOID MELALUI  
KULTUR JARINGAN TANAMAN**

**THE EFFECTS OF BIOTIC AND ABIOTIC ELICITORS ON PRODUCTION OF FLAVONOIDS BY  
PLANT TISSUE CULTURE**

Indah Yulia Ningsih

Bagian Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi  
Universitas Jember, Indonesia  
Jalan Kalimantan I/ No. 2, Jember 68121  
Email: indahyulianingsih@gmail.com

**ABSTRAK**

Kultur jaringan tanaman merupakan alternatif produksi metabolit sekunder bioaktif, seperti flavonoid, yang efisien dan sangat menguntungkan. Flavonoid termasuk golongan senyawa fenolik alami pada buah, sayur, biji, kulit batang, akar, batang, dan bunga yang memiliki berbagai aktivitas biologis. Dengan menerapkan kultur jaringan tanaman, maka dapat dilakukan peningkatan produktivitas metabolit sekunder melalui perubahan ekspresi jalur metabolisme. Salah satu caranya adalah dengan menggunakan elisitor, baik elisitor biotik maupun abiotik. Elisitor bekerja dengan cara memicu pembentukan metabolit sekunder melalui pengaktifan jalur sekunder dalam merespon stres biotik dan abiotik. Hingga saat ini masih terus dilakukan berbagai penelitian untuk mengetahui jenis dan mekanisme kerja elisitor yang efektif dalam peningkatan produksi flavonoid.

**Kata kunci:** kultur jaringan tanaman, flavonoid, elisitor biotik, elisitor abiotik.

**ABSTRACT**

*Plant tissue culture appears to be a good alternative for production of bioactive secondary metabolites, such as flavonoids. These metabolites are naturally phenolic compounds in fruits, vegetables, seeds, bark, roots, stems, and flowers with various biological activities. Application of this method can increase secondary metabolites productivity through changes in expression of metabolic pathways, mainly by biotic and abiotic elicitors utilization. Elicitors influence secondary metabolites production through secondary pathway activation as a major response to biotic and abiotic stresses. Many studies have been being performed to find elicitors with an outstanding influence on the accumulation of flavonoids and its mechanisms.*

**Key words:** *plant tissue culture, flavonoids, biotic elicitors, abiotic elicitors.*

## Pendahuluan

Tanaman merupakan sumber penemuan produk obat baru yang luar biasa untuk dikembangkan. Secara konvensional, metabolit sekunder sebagai bahan bioaktif dapat diperoleh dengan cara mengekstraksi langsung dari organ tanaman. Namun, penggunaan tanaman dalam produksi senyawa yang diinginkan secara terus-menerus berpengaruh pada ketersediaan spesies tanaman tersebut. Selain itu, dibutuhkan budidaya tanaman dalam skala besar, disamping proses ekstraksi, isolasi, dan pemurnian yang memerlukan biaya cukup besar. Pada senyawa-senyawa tertentu yang diperoleh secara sintesis, harganya menjadi mahal karena struktur aktifnya sangat kompleks. Karena itu, perlu dilakukan pengembangan metode alternatif dalam ekstraksi tanaman untuk produksi senyawa bioaktif (Chattopadhyay *et al.*, 2002).

Dalam rangka mencari alternatif produksi senyawa obat yang diinginkan dari tanaman, pendekatan bioteknologi khususnya kultur jaringan tanaman memiliki potensi besar. Keuntungan dari metode ini adalah dapat dilakukan produksi senyawa alami secara kontinyu dan *reliable* (Vanisree *et al.*, 2004). Perkembangan terbaru teknik kultur

jaringan tanaman terbukti dapat meningkatkan produktivitas berkali-kali lipat (Chattopadhyay *et al.*, 2002).

Flavonoid merupakan salah satu metabolit sekunder yang terdapat pada berbagai tanaman berpembuluh terrestrial. Golongan senyawa ini termasuk kelompok senyawa fenolik alami dengan berbagai struktur kimia yang terdapat pada buah, sayur, biji, kulit batang, akar, batang, dan bunga. Adanya berbagai aktivitas biologis yang dimiliki flavonoid telah mendorong penelitian intensif terhadap sifat senyawa tersebut dan efeknya terhadap kesehatan manusia. Flavonoid dapat diproduksi dengan menggunakan berbagai pendekatan bioteknologi, seperti kultur kalus, kultur suspensi sel, dan/atau kultur organ (Jedinak *et al.*, 2004).

## Kultur Jaringan Tanaman sebagai Sumber Metabolit Sekunder

Kultur jaringan dalam bahasa Jerman disebut *gewebe kultur* atau *tissue culture* (Inggris) atau *weefsel kweek* atau *weefsel cultuur* (Belanda). Kultur jaringan tanaman merupakan teknik menumbuhkembangkan bagian tanaman baik berupa sel, jaringan, atau organ pada kondisi aseptik secara *in vitro*.

Produksi senyawa obat melalui teknik kultur jaringan tanaman memiliki berbagai kelebihan, di antaranya (Chattopadhyay *et al.*, 2002; Rao & Ravishankar, 2002; Vanisree *et al.*, 2004):

- Pengendalian suplai produk dengan tetap menjaga ketersediaan sumber tanaman.
- Peningkatan produktivitas dengan penurunan biaya produksi.
- Budidaya dilakukan pada kondisi yang terkendali dan optimal.
- Perbaikan strain menggunakan cara analog sebagaimana yang digunakan pada sistem mikroba.
- Tidak memerlukan herbisida dan pestisida berbahaya.
- Sel yang dikultur berada dalam kondisi bebas mikroba dan serangga.
- Kemungkinan mensintesis senyawa baru dan menghasilkan senyawa yang analog dengan senyawa alami.
- Tidak tergantung pada iklim, tanah, dan lokasi geografis.

Untuk mendapatkan hasil maksimal yang sesuai untuk produksi secara komersial, berbagai upaya telah difokuskan pada isolasi aktivitas biosintesis dari sel yang dikultur, yang dilakukan dengan mengoptimalkan

kondisi kultur, pemilihan strain yang produksinya tinggi, penggunaan *precursor feeding*, metode transformasi, dan teknik imobilisasi (Vanisree *et al.*, 2004). Prinsip utama dari teknik kultur jaringan adalah perbanyak tanaman menggunakan bagian vegetatif pada media buatan yang dilakukan di tempat steril. Penggunaan kultur jaringan untuk pembiakan klonal didasarkan pada asumsi bahwa jaringan secara genetik tetap stabil jika dipisahkan dari tumbuhan induk dan ditempatkan dalam kultur.

Pada prinsipnya, kultur jaringan meliputi dua kegiatan utama, yaitu mengisolasi atau memisahkan bagian tanaman dari tanaman induk; menumbuhkan dan mengembangkan bagian tanaman tersebut di dalam media yang kondisinya steril dan mampu mendorong pertumbuhan bagian tanaman menjadi tanaman yang sempurna. Dasar dari metode tersebut adalah teori Schwan dan Schleiden yang mempunyai konsep *totipotency* (*total genetic potential*), yaitu setiap sel mempunyai potensi genetik menurunkan tanaman baru yang sama seperti induknya, atau setiap sel tanaman akan menjadi tanaman lengkap jika ditumbuhkan pada media yang sesuai. Perbanyak tanaman

melalui metode atau teknik kultur jaringan dapat menghasilkan tanaman yang serupa dengan induknya atau tanaman yang mempunyai sifat baru dari tanaman induknya. Hal ini tergantung dari tujuan dan teknik yang dilakukan. Jika bagian yang diisolasi dan ditumbuhkan berasal dari bagian vegetatif, maka akan menghasilkan tanaman yang serupa dengan induknya, sedangkan jika berasal dari bagian generatif akan menghasilkan tanaman yang mempunyai sifat berbeda dengan tanaman induknya.

Dalam pelaksanaannya dijumpai beberapa tipe kultur, yakni (Bourgaud *et al.*, 2001) :

1. Kultur biji (*seed culture*)

Merupakan kultur yang bahan tanamnya menggunakan biji.

2. Kultur organ (*organ culture*)

Merupakan budidaya yang bahan tanamnya menggunakan organ, seperti ujung akar, pucuk aksilar, tangkai daun, helaian daun, bunga, buah muda, *inflorescentia*, buku batang, akar, dan lain-lain.

3. Kultur kalus (*callus culture*)

Merupakan kultur yang menggunakan jaringan, biasanya berupa jaringan parenkim sebagai bahan eksplannya (bahan tanaman).

4. Kultur suspensi sel (*suspension culture*)

Merupakan kultur yang menggunakan media cair dengan pengocokan yang terus menerus menggunakan *shaker* dan menggunakan sel atau agregat sel sebagai bahan eksplannya. Biasanya eksplan yang digunakan berupa kalus atau jaringan meristem.

5. Kultur protoplasma

Eksplan yang digunakan adalah sel yang telah dilepas bagian dinding selnya menggunakan bantuan enzim. Protoplas diletakkan pada media padat, dibiarkan agar membelah diri dan membentuk dinding selnya kembali. Kultur protoplas biasanya untuk keperluan hibridisasi somatik atau *fusi sel soma* (fusi 2 protoplas baik intraspesifik maupun interspesifik).

6. Kultur haploid

Merupakan kultur yang berasal dari bagian reproduktif tanaman, yaitu kepala sari/*anthera* (kultur *anthera*/kultur mikrospora), tepung sari/*pollen* (kultur *pollen*), *ovulum* (kultur *ovulum*), sehingga dapat dihasilkan tanaman haploid.

### Strategi Peningkatan Produksi Metabolit Sekunder melalui Kultur Jaringan Tanaman

Dalam dekade terakhir telah dicapai kemajuan dalam stimulasi pembentukan dan akumulasi metabolit sekunder menggunakan kultur jaringan tanaman, di antaranya (Rao & Ravishankar, 2002):

1. Memperoleh *cell lines* yang efisien untuk pertumbuhan
2. Skrining *cell lines* yang pertumbuhannya tinggi untuk menghasilkan metabolit tertentu
  - a. Mutasi sel.
  - b. Perubahan media untuk hasil yang lebih tinggi.
3. Imobilisasi sel untuk meningkatkan hasil metabolit ekstraseluler dan untuk memfasilitasi biotransformasi.
4. Penggunaan elisitor biotik dan abiotik untuk meningkatkan produktivitas dalam waktu singkat dengan menstimulasi jalur metabolik
5. Penambahan prekursor senyawa yang diinginkan pada media kultur untuk meningkatkan produksi atau menginduksi perubahan fluks karbon yang mempengaruhi ekspresi jalur metabolisme
6. Permeasi metabolit untuk *downstream processing*

7. Adsorpsi metabolit untuk mempartisi produk dari media

8. *Scale-up* kultur sel pada bioreaktor yang sesuai

### Mekanisme dan Klasifikasi Elisitor

Elisitor merupakan molekul yang menstimulasi pertahanan diri atau respon yang diinduksi stres pada tanaman. Elisitor juga didefinisikan sebagai senyawa yang diberikan pada kadar kecil pada sistem sel hidup untuk menginisiasi atau meningkatkan biosintesis senyawa-senyawa tertentu (Namdeo, 2007). Tanaman menghasilkan metabolit sekunder sebagai mekanisme pertahanan terhadap serangan patogen. Elisitor memicu pembentukan metabolit sekunder dengan mengaktifkan jalur sekunder dalam merespon stres. Penggunaan elisitor pada mekanisme pertahanan tanaman, yang disebut elisitasi, merupakan salah satu strategi paling efektif dalam meningkatkan produktivitas metabolit sekunder bioaktif (Sharma *et al.*, 2011).

Hingga saat ini mekanisme yang tepat dari elisitasi kurang dipahami. Berbagai mekanisme dihipotesiskan, seperti *messenger*  $Ca^{2+}$ , faktor-faktor yang mempengaruhi integritas membran sel, inhibisi/aktivasi jalur

intraseluler, perubahan stres osmotik, dan lain-lain. Beberapa peneliti membuat hipotesis pengikatan elisitor pada reseptor membran plasma untuk proses elisitasi. Gelli *et al.* (1997) dalam Namdeo (2007) melaporkan influks  $\text{Ca}^{2+}$  ke sitoplasma dari lingkungan ekstraseluler dan intraseluler reservoir  $\text{Ca}^{2+}$ . Penelitian Romeis (2001) menyoroti perubahan yang cepat dalam pola fosforilasi protein dan aktivasi protein kinase sebagai mekanisme elisitasi. Sementara penelitian lain mengamati stimulasi *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) dan aktivasi G-protein (Droillard *et al.*, 2000; Roos *et al.*, 1999). Armero & Tena (2001) memperkirakan terjadinya pengasaman sitoplasma disebabkan oleh inaktivasi  $\text{H}^+$ -ATPase, sedangkan penurunan polarisasi membran dan peningkatan pH ekstraseluler terjadi pada pemaparan elisitor terhadap jaringan tanaman. Pugin *et al.* (1997) menjelaskan produksi ROS seperti anion superoksida dan  $\text{H}_2\text{O}_2$  yang kemungkinan memiliki efek antimikroba langsung dan berkontribusi terhadap pembentukan turunan asam lemak bioaktif. Mekanisme elisitasi yang tepat merupakan studi yang sangat kompleks dan masih dilakukan penelitian secara kontinyu. Semua elisitor tidak mengikuti

urutan proses yang sama, namun bervariasi berdasarkan asalnya, spesifisitas, kadar, lingkungan fisikokimia, tahapan siklus pertumbuhan, *uptake* nutrien, dan lain-lain.

Elisitor biotik pertama kali dipublikasikan pada awal 1970. Sejak itu banyak publikasi yang mengumpulkan bukti bahwa senyawa-senyawa turunan patogen menginduksi respon pertahanan pada tanaman utuh atau kultur sel tanaman. Elisitor tersebut terdiri dari oligosakarida atau liposakarida dan glikoprotein. Elisitor biotik seringkali berasal dari patogen (elisitor eksogen), tetapi dalam beberapa kasus, elisitor tersebut dirilis dari tanaman yang diserang oleh enzim dari patogen (elisitor endogen) (Roos *et al.*, 1999). Elisitor eksogen berasal dari luar sel, termasuk hasil reaksi atau yang melalui mediator endogen. Beberapa contohnya adalah polisakarida (glukomanosa, glukana, chitosan), peptida sebagai polikation (monilikolin, poli-L-lisin, poliamin, glikoprotein), enzim (poligalakturonase, lyase, selulase), dan asam lemak (asam arakidonat, asam eikosapentanoat). Elisitor endogen dibentuk melalui reaksi sekunder yang diinduksi sinyal biotik atau abiotik alami dalam sel. Beberapa

contohnya adalah dodeka- $\beta$ -1,4-D-galakturonida, hepta- $\beta$ -glukosida, dan oligomer alginat (Namdeo, 2007; Shilpa *et al.*, 2010).

Elisitor biotik dan abiotik digunakan untuk menstimulasi produksi metabolit sekunder pada kultur jaringan tanaman, sehingga mengurangi waktu proses untuk memperoleh kadar produk yang tinggi dan volume kultur yang meningkat (Rao & Ravishankar, 2002; Anand, 2010). Elisitor biotik memiliki sifat biologis, berasal dari patogen atau dari tanaman sendiri, sedangkan elisitor abiotik tidak memiliki sifat biologis dan dikelompokkan sebagai faktor fisika dan senyawa kimia. Berikut ini adalah beberapa tipe elisitor, yaitu (Sharma *et al.*, 2011; Patel & Krishnamurthy, 2013):

#### 1. Elisitor Biotik

- Turunan polisakarida dari dinding sel tanaman (pektin atau selulosa), mikroorganisme (kitin atau glukon), dan glikoprotein.
- Asam organik dengan berat molekul rendah.
- Senyawa fitokimia dengan berat molekul rendah yang dihasilkan tanaman dalam merespon kerusakan fisik, serangan roden, herbivora, serangga, jamur, virus atau bakteri.
- Proteinkinase

#### 2. Elisitor Abiotik

- Senyawa kimia seperti garam anorganik, logam berat, beberapa senyawa yang mengganggu integritas membran. Senyawa kimia dan polutan (logam berat, pestisida, dan aerosol), air yang berlebihan, dan kurangnya nutrisi dalam tanah.
- Faktor fisik, seperti luka mekanis, iradiasi ultraviolet, salinitas yang tinggi, osmolaritas yang tinggi atau rendah, angin dengan suhu ekstrim (partikel debu dan pasir), kekurangan air, adanya ozon atau tekanan tinggi.

#### **Produksi Flavonoid melalui Kultur Jaringan Tanaman**

Produksi flavonoid melalui teknik kultur jaringan telah dilaporkan untuk kultur kalus dan kultur suspensi sel. Spektrum senyawa yang dihasilkan tergantung pada pemilihan spesies tanaman yang tepat, jenis eksplan dan kondisi kultur. Dari jenis flavonoid yang berbeda, produksi antosianin dalam bentuk glikosidik dan katekin sebagai aglikon merupakan yang paling sering dilaporkan. Produksi flavonoid dalam kultur jaringan lebih efektif pada kultur kalus. Dalam hal ini, telah dibuktikan bahwa dimungkinkan dilakukan produksi kedua bentuk flavonoid, yaitu

aglikon dan bentuk terglukosilasinya selain produksi flavonoid terprenilasi dan terasetilasi (Jedinak *et al.*, 2004).

Kemampuan memanipulasi biosintesis flavonoid pada spesies tanaman berkembang pesat dari segi urgensinya karena adanya peningkatan penggunaannya, seperti di bidang pangan, kualitas makanan, dan *nutraceutical*. Rekayasa metabolik, yaitu modulasi jaringan metabolik dan biosintesis dari suatu organisme dengan tujuan fluks metabolik langsung ke jalur biokimia dari molekul penting tertentu, akan menjadi teknik yang penting dalam meningkatkan produksi sel tanaman untuk menghasilkan flavonoid yang diinginkan. Pengenalan gen baru atau perubahan gen pada tanaman melalui transformasi genetik, baik dengan *A. tumefaciens* atau *A. rhizogenes*, dapat digunakan untuk tujuan rekayasa metabolik. Terdapat tiga jenis gen yang berhasil digunakan dalam modifikasi transgenik dari jalur flavonoid, yaitu: gen struktural yang mengontrol tahapan biosintesis dari berbagai kelas flavonoid atau tahapan modifikasi flavonoid; gen pengatur yang mengkode faktor transkripsi yang mengaktifkan atau menonaktifkan seluruh atau sebagian jalur metabolik; dan gen yang bertindak secara tidak

langsung (misalnya melalui modifikasi pH vakuolar, interaksi dengan ion logam atau faktor transkripsi) pada akumulasi flavonoid dalam sel tanaman. Karena dapat diterapkan baik pada tanaman maupun kultur sel, rekayasa metabolik menjadi teknik yang dapat meningkatkan produksi sel tanaman untuk menghasilkan senyawa fitokimia yang diinginkan, termasuk flavonoid (Jedinak *et al.*, 2004).

#### **Penggunaan Elisitor Biotik dan Abiotik pada Produksi Flavonoid**

Azeez & Ibrahim (2013) menerapkan teknik kultur jaringan pada *Hypericum triquetrifolium* Turra dimana kalus diinisiasi pada cakram daun yang dikultur pada media MS ditambah dengan thidazirion (TDZ) pada kadar 1,0; 1,25; 1,5; 2,0; atau 2,5 mg/L dan *indole-3-acetic acid* (IAA) 0,5 mg/L; kalus juga diinisiasi pada eksplan batang di medium MS dengan penambahan 1,25 mg/L 6-benzil-aminopurin (BAP) dan 0,5 mg/L IAA. Metode HPLC digunakan untuk menentukan jenis dan jumlah metabolit sekunder yang dibandingkan dengan standar. Ekstrak jamur *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, dan ragi komersial ditambahkan ke medium cair MS pada kadar 0,1; 0,25; 0,5; atau 0,75 mg/L. Data yang diperoleh menunjukkan

akumulasi katekin pada kultur suspensi daun meningkat secara signifikan ketika ekstrak *A. niger* ditambahkan pada semua kadar. Produksi rutin, hipersoid, dan kuersetin pada kultur suspensi batang meningkat secara signifikan ketika terpapar elisitor jamur *A. niger*, *F. oxysporum*, dan ekstrak ragi (Azeez & Ibrahim, 2013).

Gadzovska-Simic *et al.* (2012) menginvestigasi produksi fenil propanoid (senyawa fenolik, flavanol, flavonol, dan antosianin) pada suspensi sel *Hypericum perforatum* L. terelisisasi. Untuk menentukan apakah produksi metabolit sekunder dapat ditingkatkan, suspensi sel *H. perforatum* dipapar ekstrak miselia dari jamur *A. flavus*. Kultur suspensi sel *H. perforatum* terelisisasi menunjukkan adanya penurunan pertumbuhan dan viabilitas, serta modifikasi produksi metabolit sekunder. Ekstrak miselia jamur *A. flavus* (50 mg/mL) menyebabkan penurunan kandungan senyawa fenolik 2 kali lipat setelah 4-21 hari elisitasi dibandingkan dengan kontrol. Sedangkan sel *H. perforatum* terelisisasi memiliki kandungan flavanol dan flavonol yang lebih tinggi pada hari ke-7.

Pada penelitian yang dilakukan oleh Mendhulkar<sup>a</sup> & Wakil (2013),

elisitor chitosan dan *A. niger* digunakan sebagai elisitor kimia dan jamur untuk meningkatkan akumulasi flavonoid total secara *in vitro* pada kultur suspensi sel *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees dalam media MS 50 mL yang ditambah 2,4-D : BAP (1,0 : 0,5 mg/L). Analisis kuantitatif dari akumulasi flavonoid total dilakukan dengan metode kalorimetri aluminium klorida. Hasil penelitian menunjukkan bahwa paparan chitosan 20 mg selama 24 jam menimbulkan efek elisitasi tertinggi dari flavonoid yaitu 3,51 mg/g (2,72 kali lipat) dibandingkan dengan kontrol. *A. niger* 2 mL selama 4 hari dapat menginduksi peningkatan kandungan flavonoid 1,39 kali lipat (3,37 mg/g) dibandingkan kontrol.

Baque *et al.* (2012) menginvestigasi pengaruh chitosan dan pektin dengan berbagai kombinasi pada akumulasi flavonoid pada kultur suspensi akar adventif dari *Morinda citrifolia*. Kadar optimum elisitor untuk meningkatkan biosintesis metabolit terjadi pada kadar 0,2 mg/mL chitosan dengan diperolehnya 75,32 mg/g DW flavonoid atau meningkat sebesar 12% dibandingkan dengan kultur tanpa elisitor. Elisitor tersebut diberikan pada hari ke-28 dan dipanen setelah 2 hari elisitasi.

Dalam penelitian Manjula & Mythili (2012) dilakukan pemaparan elisitor biotik berupa ragi dan *A. niger*, dan  $\text{CaCl}_2$  sebagai elisitor abiotik pada kultur *Mardilea quadrifolia* dalam media MS. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pertumbuhan meningkat secara bertahap dengan penambahan elisitor jamur dalam medium. Seiring dengan peningkatan kadar elisitor *A. niger*, ragi dan  $\text{CaCl}_2$  dalam medium, akumulasi karbohidrat, protein, flavonoid, dan fenol juga mengalami peningkatan.

Untuk mengetahui pengaruh suhu terhadap kultur kalus *Heliotropium indicum* L. dalam medium MS dilakukan inkubasi suhu 20, 25, 30 dan 32 °C pada kultur tersebut, kemudian dianalisa kadar fenolik total, flavonoid, dan aktivitas penangkapan radikal bebasnya. Biomassa kalus menurun dibandingkan kontrol ( $1,92 \pm 0,01$  g/tube). Tekstur kalus sama untuk semua perlakuan, namun warnanya sedikit berbeda. Kandungan fenolik total tertinggi ( $10,29 \pm 0,09$  mg/g) dan aktivitas penangkapan radikal bebas tertinggi ( $53,17 \pm 1,43$ ) dihasilkan pada perlakuan suhu 30 °C, sedangkan kandungan flavonoid tertinggi ( $1,67 \pm 0,04$  mg/g) terjadi akibat perlakuan suhu 25 °C (Kumar *et al.*, 2012).

Alvero-Bascos & Ungson (2012) melakukan studi terhadap kultur kalus *Jatropha* (*Jatropha curcas* L.) yang tumbuh di medium MS dengan tambahan *naphthalene-acetic acid* (NAA 20  $\mu\text{M}$ ) dan 6-furfurilaminopurin (kinetin 20  $\mu\text{M}$ ) dan diberi paparan radiasi UV-B sebagai elisitor abiotik dalam produksi flavonoid. Sebelum diradiasi, kadar flavonoid yaitu apigenin, vitexin, dan isovitexin dalam ekstrak daun dan kalus ditentukan dengan HPLC. Hasil penelitian menunjukkan bahwa vitexin dan isovitexin adalah flavonoid yang dominan dalam daun, sementara hanya apigenin yang terdeteksi pada kalus. Hal tersebut menunjukkan adanya korelasi antara tingkat diferensiasi dan biosintesis flavonoid pada jaringan tanaman. Iradiasi kultur kalus selama 7 hari menggunakan dua dosis UV-B (12,6 dan 25,3  $\text{kJ/m}^2$ ) menginduksi sintesis dari ketiga flavonoid tersebut (meningkat hingga 780  $\mu\text{g/g}$  DW) ke kadar yang sama atau lebih tinggi daripada daun. Gabungan kadar dari ketiga flavonoid pada kultur yang diberi perlakuan dosis UV-B 25,3  $\text{kJ/m}^2$  meningkat 20 kali lipat daripada kontrol. Sedangkan pada perlakuan dosis UV-B 12,6  $\text{kJ/m}^2$ , diperoleh peningkatan kandungan ketiga

flavonoid tersebut pada daun sebanyak 10 kali lipat. Selain itu, analisis *random amplified polymorphic DNA* (RAPD) ekstrak DNA dari daun dan kalus menunjukkan bahwa radiasi UV-B meningkatkan sintesis flavonoid tanpa mengubah urutan DNA. Hasil ini lebih mendukung keterlibatan UV-B dalam regulasi transkripsi ekspresi gen biosintesis flavonoid. Secara keseluruhan, temuan ini menunjukkan bahwa elisitasi melalui radiasi UV-B merupakan strategi efektif untuk menginduksi produksi flavonoid dalam kultur *J. curcas* yang berdiferensiasi dan telah kehilangan kemampuannya untuk menghasilkan flavonoid yang disintesis secara normal dalam organ utuh.

Karena produksi metabolit sekunder kultur suspensi *Trifolium pratense* L. rendah, maka diperlukan upaya untuk meningkatkannya dengan elisitasi. Kasparova *et al.* (2012) menggunakan 2-(2-fluoro-6-nitrobenzil sulfanil) piridin-4-karbotioamida sebagai elisitor dimana efek elisitasi terbaik terhadap flavonoid diperoleh setelah pemberian paparan selama 6 jam untuk kadar dari 1, 10, dan 100  $\mu\text{mol/L}$ . Kandungan maksimum flavonoid (5,78 mg/g DW) diinduksi pemaparan kadar elisitor terbesar, yaitu 100  $\mu\text{mol/L}$  selama 6 jam. Kadar ini

meningkat 142% dibandingkan dengan kontrol.

Mendhulkar<sup>b</sup> & Vakil (2013) menggunakan asam salisilat dan ekstrak *Penicillium expansum* sebagai elisitor kimia dan jamur untuk meningkatkan sintesis kandungan flavonoid total dalam kultur suspensi *A. paniculata*. Elisitor asam salisilat 0,05 mM, 0,5 mM, dan 1,5 mM ditambahkan pada suspensi sel *A. paniculata* dan diobservasi selama 24, 48, dan 72 jam. *P. expansum* ditambahkan sebanyak 0,3%, 0,6%, dan 1,2% pada kultur suspensi *A. paniculata* selama 2, 5, dan 8 hari. Semua elisitor diberikan pada akhir fase eksponensial (usia kultur 25 hari). Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan asam salisilat selama 24 jam dengan kadar 0,05 mM menyebabkan peningkatan kandungan flavonoid total sebesar 1,39 kali lipat (1,72 mg/g), sedangkan elisitor *P. expansum* (1,2%, 2 hari) menyebabkan peningkatan 1,59 kali lipat (2,38 mg/g) dibandingkan dengan kontrol (1,49 mg/g).

Senyawa baru turunan *pyrazinecarboxamide*, yaitu N-(2-bromo-3-methylphenyl)-5-*tert*-butylpyrazin-2-carboxamide telah digunakan sebagai elisitor terhadap produksi flavonoid pada *Ononis arvensis*

dengan metode HPLC. Senyawa tersebut dapat meningkatkan produksi flavonoid pada kultur kalus *O. arvensis* secara signifikan. Kandungan flavonoid tertinggi dihasilkan pada perlakuan elisitor dengan kadar  $8,36 \times 10^{-6}$  mol/L selama 48 jam (Tumova *et al.*, 2011).

Dalam penelitian Lei *et al.* (2011), diinvestigasi pengaruh unsur Praseodymium (Pr) pada produksi flavonoid dan enzim kunci biosintesis, yaitu peroksidase (POD; EC 1.11.1.7), polifenol oksidase (PPO; EC 1.10.3.1), dan fenilalanin amonylase (PAL; EC 4.3.1.5) dalam akar rambut *Scutellaria viscidula*. POD, PPO dan PAL merupakan tiga enzim penting yang terlibat dalam jalur biosintesis senyawa fenolik termasuk flavonoid, dan bertindak sebagai enzim pelindung terhadap berbagai *environmental stress*, seperti stres hipoksia dan stres toksisitas dari logam berat Pr yang berlebihan. Setelah 7 hari usia kultur suspensi, aktivitas POD, PPO dan PAL, dan produksi flavonoid total menunjukkan kecenderungan respon yang sama, yaitu meningkat dan kemudian menurun seiring dengan peningkatan kadar  $Pr^{3+}$ , dan kadar  $Pr(NO_3)_3$  mencapai *knee point* pada kadar 15 mmol/L.

Krolicka *et al.* (2008) meneliti tentang pengaruh elisitor *jasmonic acid*,

defisiensi nitrogen, dan *lysate A. rhizogenes* terhadap sintesis flavonoid yang menyebabkan peningkatan aktivitas bakterisidal dari ekstrak *Dionaea muscipula* dan *D. capensis* yang ditanam secara *in vitro*. Analisis HPLC menunjukkan bahwa penambahan L-fenilalanin dan depleksi nitrogen menyebabkan akumulasi kuersetin meningkat (1,6-2 kali lipat dibandingkan kontrol). Demikian pula pada akumulasi mirisetin (meningkat 1,6-1,8 kali lipat dibandingkan kontrol). Dari uji aktivitas, ternyata hanya mirisetin yang menunjukkan sifat antibakterial lemah terhadap dua strain *S. aureus* dengan MBC 150  $\mu\text{g/mL}$ .

Pada penelitian Krishnan & Kumar (2013) diinvestigasi pengaruh beberapa elisitor terhadap produksi flavonoid dalam kultur suspensi *Marchantia linearis* Lehm & Lindenb. Kation seperti ferrous ( $Fe^{2+}$ ) memicu sintesis flavonoid dengan peningkatan produktivitas sebesar  $12 \pm 1.2$  mg/L/hari. Tekanan osmotik yang dihasilkan dari penambahan NaCl atau manitol menurunkan produktivitas flavonoid. *Methyl jasmonate* dan 2-(2-fluoro-6-nitrobenzylsulfanyl) pyridine-4-carbothioamide menunjukkan efek positif pada peningkatan kadar flavonoid intraseluler dalam kultur sel.

2-(2-fluoro-6-nitrobenzylsulfanyl)pyridine-4-carbothioamide menunjukkan efek elisitasi terbaik setelah perlakuan 48 jam dengan kadar 1  $\mu\text{mol/L}$ . Kandungan flavonoid dalam sampel *in vitro* berkisar 4,0-17,7 mg kuersetin/g jaringan. Flavonoid yang difraksinasi dengan HPLC-PAD menunjukkan adanya kuersetin (182,5  $\mu\text{g/g}$ ), luteolin (464,5  $\mu\text{g/g}$ ), dan apigenin (297,5  $\mu\text{g/g}$ ).

Kakoniova *et al.* (2009) meneliti tentang pengaruh  $\text{CdCl}_2$  atau  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$  terhadap kandungan flavonoid pada kultur kalus *Rubia tinctorum* L. Efek elisitasi terbesar dari garam Cd tampak setelah 24 dan 48 jam. Kadar yang paling efektif terjadi pada paparan  $\text{CdCl}_2$ , yaitu sebesar 0,005 mg/L, dimana kandungan flavonoid meningkat 57-64% dibandingkan dengan kontrol.

Stoynova-Bakalova *et al.* (2009) melakukan studi mengenai efek sitokinin dan metil jasmonat (JAMe) tunggal ataupun dalam kombinasi terhadap kandungan flavonol dari kotiledon zucchini (*Cucurbita pepo*) yang dikultur dengan ada atau tidak ada  $\text{Cu}^{2+}$ . Selama pertumbuhan kotiledon dalam pencahayaan diurnal intensif, rutin diidentifikasi sebagai senyawa flavonol utama. Akumulasinya sangat terstimulasi oleh *phenylurea* sitokinin

(4PU-30), tetapi menurun dengan adanya  $\text{Cu}^{2+}$ . JAMe menunjukkan efek penghambatan, baik sendirian ataupun dengan penambahan  $\text{Cu}^{2+}$  atau sitokinin secara simultan. Pada kadar 100  $\mu\text{M}$  dan 250  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  meningkatkan stimulasi 4PU-30 terhadap akumulasi rutin. Namun, pada kadar yang lebih tinggi atau dengan adanya senyawa lain dapat menurunkan kadar rutin. Kadar flavonol lain yang terdeteksi, yaitu *kaempferol-3-rhamnosida* meningkat setelah penambahan JAMe atau 4PU-30.

Pada penelitian Bota & Deliu (2011), efek elisitor abiotik  $\text{CuSO}_4$  terhadap produksi flavonoid dari kultur sel *Digitalis lanata* diuji menggunakan dua *cell lines* (*line* 11 dan 13C-100). Pada pengujian pertama, produksi tertinggi flavonoid terjadi untuk kedua *cell lines* pada kadar elisitor terkuat (8  $\mu\text{M}$ ). Sedangkan pada pengujian kedua, produksi flavonoid tertinggi diinduksi pada *line* 11 setelah 24 jam elisitasi (lebih dari 10 kali lipat dibandingkan dengan kontrol, dari 0,624 mg/g DW menjadi 6 mg/g DW) pada kadar elisitor tertinggi (40  $\mu\text{M}$ ).

### Kesimpulan

Adanya keterbatasan dalam memperoleh metabolit sekunder

bioaktif dari tanaman utuh mendorong perkembangan aplikasi kultur jaringan tanaman. Untuk meningkatkan produksinya diperlukan berbagai strategi. Salah satunya adalah dengan menggunakan elisitor, baik elisitor biotik maupun abiotik. Elisitasi sistem kultur jaringan tanaman menjanjikan karena beberapa penelitian menunjukkan hasil yang baik dalam meningkatkan produksi metabolisme sekunder, khususnya flavonoid, tanpa pengaruh faktor lingkungan yang merugikan.

#### Daftar Pustaka

- Alvero-Bascos, E.M., Ungson, L.B., 2012. Ultraviolet-B (UV-B) radiation as an elicitor of flavonoid production in callus cultures of jatropha (*Jatropha curcas* L.). *Philipp Agric Scientist*, 95(4):335-43.
- Anand, S., 2010. Various approach for secondary metabolite production through plant tissue culture. *Pharmacia*, 1(1):1-7.
- Armero, J., Tena, M., 2001. Possible role of plasma membrane  $h^+$ -atpase in the elicitation of phytoalexin and related isoflavone root secretion in chickpea (*Cicer arietinum* L.) seedlings. *Plant Science*, 161:791-8.
- Azeez, H.A., Ibrahim, K.M., 2013. Effect of biotic elicitors on secondary metabolite production in cell suspensions of *Hypericum triquetrifolium* Turra. *Bulletin UASVM Horticulture*, 70(1):26-33.
- Baque, Md.A., Shiragi, Md.H.K., Lee, E., Paek, K., 2012. Elicitor effect of chitosan and pectin on the biosynthesis of anthraquinones, phenolics and flavonoids in adventitious root suspension cultures of *Morinda citrifolia* (L.). *Australian Journal of Crop Science*, 6(9):1349-1355.
- Bota, C., Deliu, C., 2011. The effect of copper sulphate on the production of flavonoids in *Digitalis lanata* cell cultures. *Farmacia*, 59(1):113-118.
- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, E., Gontier, E., 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*, 161:839-851.
- Chattopadhyay, S., Farkya, S., Srivastava, A.K., Bisaria, V.S., 2002. Bioprocess considerations for production of secondary metabolites by plant cell suspension cultures. *Biotechnol. Bioprocess Eng*, 7:138-149.
- Droillard, M.J., Thibivilliers, S., Cazale, A.C., Barbier-Brygoo, H., Lauriere, C., 2000. Protein kinases induced by osmotic stresses and elicitor molecules in tobacco cell suspensions: two crossroad MAP kinases and one osmoregulation-specific protein kinase. *FEBS Lett*, 474:217-222.
- Gadzovska-Simic, S., Tusevski, O., Antevski, S., Atanasova-Pancevska, N., Petreska, J., Stefova, M., Kungulovski, D., and Spasenoski, M., 2012. Secondary metabolite production in *Hypericum*

- perforatum* L. cell suspensions upon elicitation with fungal mycelia from *Aspergillus flavus*. *Arch. Biol. Sci., Belgrade*, 64(1):113-121.
- Gelli, A., Higgins, V.J., Blumwald, E., 1997. Activation of plant plasma membrane  $Ca^{2+}$ -permeable channels by race-specific fungal elicitors. *Plant Physiol*, 113:269-279.
- Jedinak, A., Farago, J., Psenakova, I., Maliar, T., 2004. Approaches to flavonoid production in plant tissue cultures. *Biologia, Bratislava*, 59(6):697-710.
- Kakoniova, D., Vaverkova, S., Liskova, D., Urgeova, E., Jurakova Z., 2009. The possibility to enhance flavonoids production in *Rubia tinctorum* L. callus cultures. *Nova Biotechnologica*, 9(2):191-197.
- Kasparova, M., Siatka, T., Klimesova, V., Dusek, J., 2012. New synthetic pyridine derivate as potential elicitor in production of isoflavonoids and flavonoids in *Trifolium pratense* L. suspension culture. *The Scientific World Journal*: 1-5.
- Krishnan, R., Kumar, V.S.A., 2013. Establishment of cell suspension culture in *Marchantia linearis* Lehm & Lindenb. for the optimum production of flavonoids. *Biotech*, 4:49-56.
- Krolicka, A., Szpitter, A., Gilgenast, E., Romanik, G., Kaminski, M., dan Lojkowska, E., 2008. Stimulation of antibacterial naphthoquinones and flavonoids accumulation in carnivorous plants grown *in vitro* by addition of elicitors. *Enzyme and Microbial Technology*, 42:216-221.
- Kumar, M.S., Balachandran, S., Chaudhury, S., 2012. Influence of incubation temperatures on total phenolic, flavonoids content and free radical scavenging activity of callus from *Heliotropium indicum* L. *Asian J. Pharm. Res*, 2(4):148-152.
- Lei, W., Shui, X., Zhou, Y., Tang, S., Sun, M., 2011. Effects of praseodymium on flavonoids production and its biochemical mechanism of *Scutellaria viscidula* hairy roots *in vitro*. *Pak. J. Bot*, 43(5):2387-2390.
- Manjula, R., Mythili, T., 2012. Improved phytochemical production using biotic and abiotic elicitors in *Marsilea quadrifolia*. *Int. J. Curr. Sci*, 98-101.
- Mendhulkar<sup>a</sup>, V.D., Vakil, M.M.A., 2013. Chitosan and *Aspergillus niger* mediated elicitation of total flavonoids in suspension culture of *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 4(4):731-740.
- Mendhulkar<sup>b</sup>, V.D., Vakil, M.M.A., 2013. Elicitation of flavonoids by salicylic acid and *Penicillium expansum* in *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees. cell culture. *Research in Biotechnology*, 4(2):1-9.
- Namdeo, A.G., 2007. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. *Pharmacognosy Reviews*, 1(1):69-79.

- Patel, H., Krishnamurthy, R., 2013. Elicitors in plant tissue culture. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2(2):60-65.
- Pugin, A., Frachisse, J.M., Tavernier, E., Bligny, R., Gout, E., Douce, R., Guern, J., 1997. Early events induced by the elicitor cryptogein in tobacco cells: involvement of a plasma membrane NADPH oxidase and activation of glycolysis and the pentose phosphate pathway. *Plant Cell*, 9:2077-2091.
- Rao, S.R., Ravishankar, G.A., 2002. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 20:101-153.
- Romeis, T., 2001. Protein kinases in the plant defense response. *Curr Opin Plant Biol*, 4:407-414.
- Roos, W., Dordschbal, B., Steighardt, J., Hieke, M., Weiss, D., Saalbach G., 1999. A redox dependent, g-protein-coupled phospholipase a of the plasma membrane is involved in the elicitation of alkaloid biosynthesis in *Eschscholtzia californica*. *Biochim Biophys Acta*, 1448(3):390-402.
- Sharma, M., Sharma, A., Kumar, A., Basu, S.K., 2011. Enhancement of secondary metabolites in cultured plant cells through stress stimulus. *American Journal of Plant Physiology*, 6(2):50-71.
- Shilpa, K., Varun, K., Lakshmi, B.S., 2010. An alternate method of natural drug production: eliciting secondary metabolite production using plant cell culture. *Journal of Plants Sciences*, 5(3):222-247.
- Stoyanova-Bakalova, E., Nikolova, M., Maksymiec, W., 2009. Effect of  $Cu^{2+}$ , cytokinins and jasmonate on content of two flavonols identified in zucchini cotyledons. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 52(2):77-83.
- Tumova, L., Tuma, J., Dolezal, M., 2011. Pyrazinecarboxamides as potential elicitors of flavonolignan and flavonoid production in *Silybum marianum* and *Ononis arvensis* cultures in vitro. *Molecules*, 16:9142-9152.
- Vanisree, M., Lee, C., Lo, S., Nalawade, S.M., Lin, C.Y., Tsay, H., 2004. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. *Bot. Bull. Acad. Sin*, 45:1-22.