

Analisis Total Fenolik dan Total Flavonoid pada Ekstrak Daun *In Vitro* Cabai Merah Besar (*Capsicum annuum* L.) Menggunakan Spektrofotometri UV-Vis

Analysis of Phenolic and Flavonoid Content in *In Vitro* Leaf Extracts of Great Red Chili (*Capsicum annuum* L.) Using UV-Vis Spectrophotometry

Hani Fitriani^{1*}, Diny Dinarti², Arya Widura Ritonga², Wahyuni³, dan N. Sri Hartati³

¹Pusat Riset Botani Terapan, Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN), 16911, Indonesia

²Program Studi Bioteknologi Tanaman, Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor (*IPB University*), Jl. Meranti Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680, Indonesia

³Pusat Riset Rekayasa Genetika, Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN), 16911, Indonesia

*Penulis Korespondensi: hanifitriani78@gmail.com

Disetujui: 25 Januari 2026 / *Published Online* Mei 2026

ABSTRAK

Cabai (*Capsicum annuum* L.) sebagai komoditas hortikultura bernilai ekonomi tinggi memiliki keragaman fisiologis dan biokimia antar genotipe. Kajian mengenai dinamika pertumbuhan dan akumulasi metabolitnya penting dilakukan untuk mengoptimalkan efisiensi kultur *in vitro* serta produksi senyawa bioaktif. Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh umur kultur dan perbedaan varietas terhadap pertumbuhan vegetatif serta kadar total fenolik dan flavonoid pada tanaman cabai yang dikulturkan secara *in vitro*. Empat varietas cabai yaitu 'Kopay', 'Laris', 'Caman', dan 'Pesona', diamati pada umur kultur 1, 2, 3, 4, dan 8 minggu setelah kultur (MSK), dengan parameter meliputi tinggi tanaman, jumlah daun, kandungan total fenol, dan total flavonoid. Secara umum, tinggi tanaman dan jumlah daun meningkat signifikan seiring bertambahnya umur kultur, meskipun pola pertumbuhan berbeda antar varietas. Berdasarkan uji homogenitas, varietas 'Caman' dan 'Pesona' pada umur kultur yang sama, yaitu 8 MSK menunjukkan pertumbuhan tertinggi terbaik dan jumlah daun terbanyak pada fase akhir kultur, sehingga dapat dijadikan sebagai kandidat unggul dan bahan baku untuk metabolisme sekunder. Berdasarkan analisis ANOVA dua arah, faktor interaksi antara faktor varietas dan umur kultur, faktor umur kultur, dan faktor varietas berpengaruh nyata terhadap kadar total fenolik dan total flavonoid pada ekstrak daun *in vitro* cabai. Kandungan total fenolik cenderung meningkat hingga 8 MSK, terutama pada varietas 'Caman', sementara total flavonoid mencapai nilai maksimum pada 2–4 MSK sebelum menurun kembali pada 8 MSK. Kadar total fenolik tertinggi terdapat pada saat umur kultur 8 MSK, yaitu 17.728 mg GAE 100 g⁻¹ dan berbeda signifikan secara statistik dibandingkan dengan umur kultur 1, 2, dan 3 MSK. Varietas 'Caman' dan 'Laris' memiliki kadar total fenolik paling tinggi (masing-masing 15.712 dan 15.614 mg GAE 100 g⁻¹) dan kadar flavonoid tertinggi (1.681 dan 1.641 mg RH 100 g⁻¹) dan tidak berbeda nyata satu sama lain tetapi berbeda nyata dari varietas lainnya. Berdasarkan hasil uji Tukey HSD, senyawa flavonoid pada kultur cabai relatif stabil dan tidak terlalu dipengaruhi oleh umur kultur. Secara keseluruhan, umur kultur 4 MSK merupakan fase optimal untuk akumulasi fenolik dan flavonoid, dengan varietas 'Caman' sebagai genotipe paling potensial untuk produksi metabolit sekunder.

Kata kunci: *Capsicum annuum*, kultur jaringan, kurva standar, metabolit sekunder, umur kultur

ABSTRACT

*Chili (*Capsicum annuum* L.) is a high-value horticultural crop that shows physiological and biochemical diversity among genotypes. Studying growth dynamics and metabolite accumulation is crucial for improving in vitro culture efficiency and bioactive compound production. This research examines how cultural age and varietal differences affect vegetative growth, total phenolic, and flavonoid content in in vitro-grown chili plants. Four varieties—'Kopay', 'Laris', 'Caman', and 'Pesona'—were observed at 1, 2, 3, 4, and 8 weeks after culture (WAC). Parameters measured included plant height, leaf number, total phenol content, and total flavonoid content. Plant height and leaf number generally increased with age, though growth patterns varied among varieties. The homogeneity test indicated that 'Caman' and 'Pesona' at 8 WAC had the best growth and highest leaf numbers, making them strong candidates for secondary metabolism studies. Two-way ANOVA indicated that variety, culture age, and their interaction significantly affected total phenol and flavonoid content in leaf extracts. Total phenol content increased up to 8 WAC, especially in 'Caman'. Total flavonoids peaked at 2–4 WAC before*

declining by 8 WAC. The highest total phenol content was at 8 WAC (17.728 mg GAE 100 g⁻¹) and was statistically higher than at 1, 2, and 3 WAC. The 'Caman' and 'Laris' varieties also had the highest phenol (15.712 and 15.614 mg GAE 100g⁻¹) and flavonoid (1.681 and 1.641 mg RE 100 g⁻¹) content, with no significant difference between them but significant differences from other varieties. The Tukey HSD test revealed that the flavonoid content was stable and not significantly affected by culture age. Overall, 4 WAC was optimal for phenol and flavonoid accumulation, with 'Caman' the most promising variety for secondary metabolites production.

Keywords: *Capsicum annum*, culture ages, secondary metabolite, standard curve, tissue culture

PENDAHULUAN

Cabai merah (*Capsicum annum* L.) termasuk ke dalam jenis sayuran dengan tingkat permintaan yang tinggi di masyarakat Indonesia sehingga tergolong komoditas hortikultura yang bernilai ekonomi tinggi. Cabai memiliki ragam manfaat bagi masyarakat Indonesia baik sebagai bahan baku masakan, bahan ramuan obat tradisional (Ahmad *et al.*, 2021) maupun sebagai bahan baku berbagai industri. Saat ini, ekstrak cabai telah diteliti yang berpotensi sebagai agen antimikroba, agen insektisida, anthelmintik, dan larvasida; memiliki sifat antiinflamasi, efek perlindungan kardiovaskular, efek anti-obesitas, aktivitas antioksidan, aktivitas antikanker, efek antiangiogenik dan anti kanker, serta sifat antitrombotik dan vasodilator (Villa-Rivera & Ochoa-Alejo, 2021).

Cabai termasuk ke dalam keluarga Solanaceae (keluarga terong-terongan) yang dikenal karena kepedasan dan nilai gizinya. Rasa pedas pada cabai karena adanya komponen kapsaikinoid. Selain kapsaikinoid, buah cabai juga mengandung banyak fitokimia lainnya seperti senyawa fenolik, flavonoid, ascorbic acid (vitamin C), karotenoid (provitamin A), Vitamin E, antosianin, dan Vitamin B5 (Alonso-Villegas *et al.*, 2023). Kandungan senyawa metabolit sekunder pada cabai tersebut memiliki peran besar bagi kesehatan manusia, industri farmasi dan pangan.

Senyawa fenolik merupakan kelompok metabolit sekunder penting yang disintesis oleh tumbuhan sebagai hasil adaptasi tumbuhan terhadap kondisi stres biotik dan abiotik seperti infeksi, luka, stres air, stres dingin, dan intensitas cahaya tinggi (Materska & Perucka, 2005). Menurut Sun *et al.* (2023), senyawa fenolik termasuk flavonoid berpotensi besar sebagai agen bioaktif dalam bidang kedokteran dan kesehatan manusia. Dalam beberapa tahun terakhir, senyawa fenolik telah menarik perhatian para peneliti karena menunjukkan potensi sebagai antioksidan yang kuat yang dapat melindungi tubuh manusia dari radikal bebas, pembentukannya terkait dengan metabolisme alami sel aerobik. Oleh karena itu, analisis total fenolik dan flavonoid pada cabai penting dilakukan karena kandungan fenolik dan

flavonoid berkorelasi kuat dengan aktivitas biologis penting seperti aktivitas antioksidan.

Kultur *in vitro* adalah metode perbanyakan atau regenerasi tanaman yang dilakukan secara aseptik dengan menggunakan eksplan pada media buatan yang mengandung nutrisi dan zat pengatur tumbuh. Pada tanaman cabai (*Capsicum* spp.), teknik ini tidak hanya dimanfaatkan untuk mempercepat perbanyakan, tetapi juga secara langsung dapat menyebabkan perubahan metabolisme yang akan memengaruhi dan meningkatkan berbagai produksi metabolit sekunder. Salah satunya, terjadi peningkatan aktivitas enzim fenilalanin amonia liase (PAL), yaitu jalur fenilpropanoid yang menghasilkan fenolik dan flavonoid (Sharma *et al.*, 2019).

Analisis fenolik dan flavonoid pada bibit cabai hasil kultur *in vitro* penting dilakukan karena kedua kelompok senyawa ini berperan besar dalam menentukan respons fisiologis tanaman terhadap lingkungan kultur yang bersifat tidak alami. Kondisi *in vitro* dengan cahaya rendah, kelembapan tinggi, serta adanya hormon eksogen sering memicu stres oksidatif dan akumulasi Reactive Oxygen Species (ROS), sehingga kadar fenolik dan flavonoid dapat digunakan sebagai indikator utama tingkat stres bibit (Kuljarusnont *et al.*, 2024). Selain itu, senyawa fenolik yang mudah teroksidasi merupakan penyebab umum pencoklatan (*browning*) media dan nekrosis jaringan, yang menghambat regenerasi tunas atau akar (North., *et al.*, 2012). Oksidasi fenolik oleh enzim seperti polyphenol oxidase (PPO) menghasilkan quinon berwarna coklat yang bersifat toksik bagi sel, sehingga pengukuran kandungannya dapat membantu menentukan kebutuhan penambahan antioksidan atau modifikasi media untuk meningkatkan viabilitas eksplan (Permadi *et al.*, 2024, Zein El Din *et al.*, 2024). Kandungan fenolik dan flavonoid juga mencerminkan kualitas fisiologis bibit sebelum aklimatisasi, karena bibit dengan kapasitas antioksidan yang baik lebih mampu bertahan terhadap perubahan lingkungan *ex vitro* (Bojan & Temelli, 2008). Variasi kadar metabolit ini dapat menjadi penanda fisiologis untuk membedakan genotipe cabai yang responsif dan tidak responsif terhadap regenerasi, serta untuk mengevaluasi efek

perlakuan hormon atau stres buatan dalam kultur (Millah *et al.*, 2021; Molla *et al.*, 2022). Dengan demikian, analisis fenolik dan flavonoid memberikan informasi penting yang mendukung optimasi kultur *in vitro* dan peningkatan kualitas bibit cabai.

Kadar total fenolik dan flavonoid pada tanaman cabai hasil kultur *in vitro* dipengaruhi oleh banyak faktor, antara lain: faktor genetik dan fase pertumbuhan (Ribes-Moya *et al.*, 2020); jenis eksplan, komposisi media dan ZPT (Hemmati *et al.*, 2020; Monfort *et al.*, 2018); kondisi kultur seperti cahaya (Weremczuk-Jeżyna *et al.*, 2021) dan suhu (Wang & Zheng, 2001), metode ekstraksi dan pelarut (Kebu *et al.*, 2024), serta metode analisis seperti Folin–Ciocalteu untuk fenolik (Nikolaeva *et al.*, 2022) dan AlCl₃ untuk flavonoid (Chang, 2002).

Berdasarkan uraian di atas, masih terbatas informasi mengenai kadar total fenolik dan flavonoid pada ekstrak daun cabai *in vitro* berdasarkan varietas cabai dan perbedaan umur kultur cabai *in vitro* dari umur 1, 2, 3, 4 dan 8 minggu setelah kultur (MSK). Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui perbedaan kadar total fenolik dan flavonoid pada masing-masing varietas cabai dan umur kulturnya dengan menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis.

BAHAN DAN METODE

Bahan Tanaman dan Persiapan Sampel

Permukaan benih cabai dari masing-masing varietas di sterilisasi di dalam laminar dengan tahapan sebagai berikut: diawali dengan benih cabai dibilas aquades steril sebanyak tiga kali. Benih direndam dalam 70% alkohol selama 5 menit dan bilas aquades steril tiga kali. Selanjutnya, benih direndam dalam 30% (v/v) larutan Clorox yang telah ditambahkan tween 20 sebanyak 1-2 tetes untuk 100 ml selama 10 menit dan benih dibilas aquades steril sebanyak tiga kali.

Tiriskan di atas tisu steril, lalu benih ditanam pada media MS0. Kultur benih cabai diinkubasi di ruang kultur dengan intensitas cahaya 1000 lux, dengan fotoperiode 16 jam terang dan 8 jam gelap, suhu 27 °C. Ekstrak daun ditimbang sebanyak 100 mg/sampel dan disimpan dalam freezer -80 °C hingga ekstrak digunakan untuk analisis total fenolik dan flavonoid.

Ekstraksi Daun *In Vitro* Cabai Merah Besar

Sampel daun *in vitro* cabai diambil dari tiga botol kultur cabai steril dan setiap botol kultur berasal dari tiga planlet, sehingga semua sampel cabai merah besar yang dianalisis sebanyak 3 ulangan. Daun dipilih untuk ekstraksi karena mengandung konsentrasi senyawa fenolik dan flavonoid paling tinggi dibandingkan bagian tanaman lain seperti batang atau akar (Martínez-Silvestre *et al.*, 2022). Selain itu, daun berfungsi sebagai pusat biosintesis dan pertahanan utama tanaman terhadap lingkungan, sehingga mengakumulasi metabolit sekunder paling banyak (Farhan *et al.*, 2012).

Sampel daun *in vitro* dimasukkan ke dalam tube 2.5 ml, digerus dengan nitrogen cair menggunakan pestel. Ekstrak daun ditimbang masing-masing 100 mg per sampel dan disimpan di dalam freezer -80 °C, jika ekstrak daun tersebut belum akan dianalisis kadar total fenolik dan flavonoidnya.

Pembuatan Larutan Standar Asam Galat (GA) dan Pengukurannya

Pembuatan larutan induk (*stock solution*) asam galat dibuat dari konsentrasi tertinggi, yaitu 1000 ppm. Sejumlah massa padatan asam galat 3 mg dilarutkan dalam pelarut metanol 3 ml. Selanjutnya, dilakukan tahap pengenceran seri (*serial dilution*), larutan induk diencerkan secara bertahap dengan metanol dari konsentrasi tinggi 1000 ppm ke konsentrasi paling rendah 5 ppm untuk mendapatkan konsentrasi seri (5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 ppm) (Tabel 1).

Tabel 1. Pengenceran larutan stok Galic Acid (GA) dengan metanol

Konsentrasi larutan GA (ppm)	Pengambilan GA dari larutan stok (µl)	Pengenceran dengan methanol (µl)	Total volume (µl)
5	250	250	500
10	375	250	725
20	500	500	1000
40	800	400	1200
60	1050	350	1400
80	1400	350	1750
100	400	1600	2000
500	250	250	500
1000	3000	3000	3000

(larutan stok)

Pengukuran larutan standar asam galat dilakukan dengan pengambilan larutan asam galat dari masing-masing konsentrasi 5, 10, 20, 40, 60, 80 dan 100 ppm sebanyak 100 µl, tambahkan akuades steril 900 ml dan reagen Folin-Ciocalteu 100 µl. Inkubasi larutan sambil dikocok selama 5 menit. Selanjutnya, larutan tersebut ditambahkan 1000 µl larutan Na₂CO₃ 7% dan tera hingga 2.5 ml dengan akuades steril, diamkan selama 90 menit pada suhu ruangan hingga warna yang dihasilkan optimal. Pindahkan 200 µl larutan ke dalam pelat mikro 90 sumur. Absorbansi pada panjang gelombang maksimum 750 nm diukur dan dibuat kurva kalibrasi hubungan antara konsentrasi asam galat (µg ml⁻¹) dengan absorbansi. Kurva standar asam galat dibuat menggunakan tujuh konsentrasi 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 ppm. Pengulangan dilakukan sebanyak 3 kali untuk masing-masing larutan standar.

Pembuatan Larutan Standar Rutin Hydrate (RH) dan Pengukurannya

Pembuatan larutan induk rutin hidrat (RH) 1000 ppm dibuat dengan menimbang 3 mg RH dilarutkan dengan pelarut metanol sebanyak 3 mL. Selanjutnya, dilakukan tahap pengenceran seri (serial dilution), larutan induk diencerkan secara bertahap dengan metanol dari konsentrasi tinggi 1000 ppm ke konsentrasi paling rendah 5 ppm untuk mendapatkan konsentrasi seri (5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 ppm). Berikut ini pengencerannya dengan metanol yang diambil dari larutan induk RH (Tabel 2).

Pengukuran RH dilakukan dengan pengambilan larutan RH dari masing-masing konsentrasi 5, 10, 20, 40, 60, 80 dan 100 ppm sebanyak 1 ml dan ditambahkan AlCl₃ 2% sebanyak 1 ml, didiamkan pada suhu ruang sambil dikocok selama 60 menit. Larutan dipindahkan ke dalam pelat mikro 90 sumur sebanyak 200 µl. Absorbansi diukur pada panjang gelombang maksimum 510 nm dan dibuat kurva kalibrasi

hubungan antara konsentrasi RH (µg ml⁻¹) dengan absorbansi. Pengulangan dilakukan sebanyak 3 kali untuk masing-masing larutan standar.

Analisis Total Fenolik

Kandungan total fenolik ekstrak daun cabai merah *in vitro* ditentukan dengan metode Folin-Ciocalteu (F-C) berdasarkan kemampuan senyawa fenolik mereduksi fosfomolibdat dalam Folin-Ciocalteu membentuk molybdenum berwarna biru (Pothitirat *et al.*, 2009). Ekstrak daun *in vitro* cabai merah sebanyak 100 µl diencerkan dengan 900 ml akuades steril dan direaksikan dengan 100 µl reagen Folin-Ciocalteu µl, 1000 µl larutan Na₂CO₃ 7%, ditera dengan akuades steril hingga 2.5 ml. Selanjutnya campuran larutan didiamkan pada suhu ruang sambil dikocok agar homogen selama 90 menit. Campuran larutan sebanyak 200 µl dimasukkan ke dalam pelat mikro 96 sumur dan ukur menggunakan spektrofotometri UV-Visible (UV-Vis). Absorbansi larutan diukur pada panjang gelombang 750 nm. Kandungan total fenolik ditentukan menggunakan kurva standar asam galat dengan berbagai konsentrasi yaitu 5, 10, 20, 40, 60, 80, dan 100 ppm. Satuan akhir analisis dinyatakan dalam mg GAE (gallic acid equivalent) 100 g⁻¹ (Vongsak *et al.*, 2013). Pengulangan dilakukan sebanyak 3 kali untuk masing-masing ekstrak.

Analisis Total Flavonoid

Analisis kadar total flavonoid ditentukan dengan metode kolorimetri AlCl₃ yang didasarkan pada pembentukan reaksi kompleks antara flavonoid dengan aluminium klorida (AlCl) dengan Rutin Hydrate (RH) sebagai larutan standar. Pereaksi AlCl₃ dengan gugus hidroksil dari senyawa flavonoid membentuk senyawa kompleks kuning (Pothitirat *et al.*, 2009). Larutan ekstrak daun *in vitro* cabai merah besar sebanyak 1 ml ditambah 1 ml AlCl₃ 2% dan didiamkan pada suhu ruang sambil dikocok agar campuran larutan tersebut homogen selama 60 menit.

Tabel 2. Pengenceran larutan stok Rutin Hydrate (RH) dengan metanol

Konsentrasi larutan RH (ppm)	Pengambilan RH dari larutan stok (µl)	Pengenceran dengan methanol (µl)	Total volume (µl)
5	600	600	1200
10	850	850	1700
20	950	950	1900
40	1400	700	2100
60	1875	625	2500
80	2320	580	2900
100	680	2720	3400
500	850	850	1700
1000	3000	3000	3000

(larutan stok)

Selanjutnya, campuran larutan sebanyak 200 μ l dimasukkan ke dalam pelat mikro 96 sumur, diukur dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Larutan diukur pada panjang gelombang 510 nm. Total flavonoid masing-masing ekstrak ditentukan dalam mg RH equivalent per 100 g sampel menggunakan persamaan dari kurva standar RH. Pengulangan dilakukan sebanyak 3 kali untuk masing-masing ekstrak.

Analisis Data

Data dianalisis menggunakan perangkat lunak SPSS Statistical Data Analysis Seri 25,0. Data pertumbuhan tanaman (tinggi tanaman dan jumlah daun) dan hasil penentuan kadar total fenolik dan total flavonoid yang diperoleh dianalisis dengan Analysis of Variance (ANOVA) pada tingkat kepercayaan 95 dan taraf α 0.05. Uji lanjut yang digunakan adalah uji Tukey.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pertumbuhan Kultur *In Vitro* Tanaman Cabai Merah

Pada Tabel 3, berdasarkan hasil analisis deskriptif terlihat jika seluruh varietas tanaman mengalami peningkatan tinggi tanaman yang signifikan seiring bertambahnya umur kultur (1-8 MSK). Pada akhir periode pengamatan (8 MSK), varietas 'Kopay' mencapai tinggi rata-rata tertinggi sebesar 10.58 cm, kemungkinan varietas 'Kopay' memiliki potensi genetik lebih baik dalam hal tinggi dibanding tiga varietas lainnya dari sisi tinggi tanaman. Peningkatan laju pertumbuhan yang paling drastis terlihat pada fase awal vegetatif antara 1 dan 2 MSK untuk semua varietas. Varietas 'Laris' menunjukkan pertumbuhan yang cenderung melambat setelah 4 MSK dibandingkan 'Caman' dan 'Kopay', yang mungkin disebabkan oleh perbedaan respons hormonal atau kebutuhan nutrisi spesifik pada fase tersebut.

Daun adalah komponen utama suatu tanaman untuk proses fotosintesis karena tempat untuk memproduksi gula dan energi (ATP, NADPH). Energi dan gula ini digunakan untuk pertumbuhan primer (memperbesar tinggi dan jumlah daun itu sendiri), tetapi kelebihan (fotosintat berlebih) menjadi bahan bakar untuk metabolisme sekunder. Semakin banyak jumlah daun yang terdapat pada suatu tanaman maka proses fotosintesis yang terjadi juga lebih tinggi, sehingga fotosintat yang dihasilkan juga lebih banyak (Pertamawati, 2010). Fotosintesis menyediakan bahan baku dan energi yang diperlukan untuk sintesis senyawa metabolit sekunder tersebut (Lingwan *et al.*, 2023).

Jumlah daun menunjukkan pola yang berbeda dibandingkan parameter tinggi (Tabel 1). Pada umur 1 MSK, keempat varietas cabai memperlihatkan jumlah daun yang sama, yaitu 2 helai daun. Namun, mulai umur 2 MSK varietas 'Laris' memperlihatkan penambahan daun yang cepat (5.3 helai daun). Pada 4 MSK, 'Caman' memiliki jumlah daun tertinggi (6.4 helai daun), dan pada 8 MSK varietas 'Pesona' menunjukkan jumlah daun tertinggi (6.7 helai daun). Hasil ini menunjukkan bahwa meskipun 'Kopay' unggul dalam tinggi, 'Pesona' lebih efisien dalam produksi biomassa daun, yang mungkin berkaitan dengan arsitektur kanopi atau efisiensi fotosintesis yang berbeda.

Untuk mengetahui homogenitas varians, dilakukan uji Levene's Test. Hasil uji menunjukkan bahwa nilai signifikansi (*p value*) adalah 0.000, yang lebih kecil dari 0.05 ($0.000 < 0.05$). Hasil ini mengindikasikan adanya perbedaan varians yang signifikan antar kelompok, sehingga asumsi homogenitas tidak terpenuhi. Oleh karena hasil uji Levene menunjukkan adanya heterogenitas varians antar kelompok ($p < 0.05$), maka uji post-hoc Games-Howell digunakan untuk mengidentifikasi letak perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan.

Tabel 3. Rata-rata tinggi tanaman dan jumlah daun tanaman cabai *in vitro* berdasarkan umur kultur

Parameter	Umur kultur (minggu setelah kultur, (MSK))				
	1	2	3	4	8
Tinggi (cm)					
'Kopay'	2.73 \pm 0.14	4.25 \pm 0.23	5.83 \pm 0.30	7.63 \pm 0.49	10.58 \pm 0.51
'Laris'	4.38 \pm 0.26	5.46 \pm 0.23	5.58 \pm 0.18	7.28 \pm 0.47	8.81 \pm 0.80
'Caman'	2.71 \pm 0.19	4.96 \pm 0.24	5.96 \pm 0.20	6.97 \pm 0.37	10.04 \pm 0.57
'Pesona'	3.33 \pm 0.28	5.04 \pm 0.32	4.17 \pm 0.43	6.26 \pm 0.28	9.00 \pm 0.40
Jumlah daun					
'Kopay'	2.0 \pm 0.0	3.8 \pm 0.13	4.4 \pm 0.34	4.7 \pm 0.43	5.0 \pm 0.17
'Laris'	2.0 \pm 0.0	5.3 \pm 0.18	5.3 \pm 0.28	5.7 \pm 0.40	5.1 \pm 0.36
'Caman'	2.0 \pm 0.0	4.3 \pm 0.30	4.3 \pm 0.13	6.4 \pm 0.39	5.3 \pm 0.18
'Pesona'	2.0 \pm 0.0	4.3 \pm 0.26	4.0 \pm 0.49	6.1 \pm 0.34	6.7 \pm 0.57

Hasil uji Games-Howell menunjukkan bahwa untuk tinggi tanaman berpengaruh nyata ($p < 0.001$) antar varietas. Varietas ‘Caman’ (8 MSK) dan ‘Pesona’ (8 MSK) menunjukkan performa terbaik untuk parameter tinggi tanaman karena memiliki jumlah perbandingan positif yang tinggi dan tidak memiliki perbandingan negatif sama sekali, sehingga dapat dijadikan sebagai kandidat unggul untuk mendapatkan tanaman yang tinggi.

Varietas ‘Kopay’, ‘Laris’, dan ‘Caman’ pada umur kultur yang sama, 4 MSK, dan ‘Pesona’ (3 MSK), lebih tinggi dari sebagian varietas, tapi masih lebih rendah dari beberapa varietas lain. Varietas ‘Kopay’ (1 dan 8 MSK), varietas ‘Caman’ dan ‘Pesona’ pada umur kultur yang sama, 1 MSK, merupakan yang paling rendah secara signifikan memiliki tinggi tanaman dan jumlah daun yang lebih rendah dibanding varietas lainnya.

Hasil uji Games-Howell menunjukkan bahwa jumlah daun berpengaruh nyata antar varietas ($p < 0.001$). Pola umum yang terlihat adalah varietas ‘Kopay’ (1 dan 8 MSK), ‘Caman’ dan ‘Pesona’ pada umur kultur yang sama, 1 MSK, cenderung memiliki jumlah daun lebih sedikit dibanding varietas lain. Beberapa varietas seperti ‘Kopay’, ‘Laris’ dan ‘Caman’ pada umur kultur yang sama, 4 MSK dan ‘Pesona’ (3 MSK) menunjukkan nilai yang sangat konsisten, namun tetap terdapat perbedaan signifikan dengan banyak varietas lain. Varietas ‘Caman’ dan ‘Pesona’ pada umur kultur yang sama, 8 MSK, memiliki jumlah daun lebih banyak dibanding varietas dan umur kultur lainnya.

Berdasarkan analisis uji lanjut Games-Howell, varietas ‘Caman’ dan ‘Pesona’ pada umur kultur yang sama, yaitu 8 MSK lebih unggul akan performa pertumbuhannya baik tinggi tanaman maupun jumlah daunnya dari tiga varietas lainnya (‘Kopay’ dan ‘Laris’ pada umur kultur yang sama, 8 MSK). Hal ini diduga adanya perbedaan respon terhadap kondisi kultur antar varietas.

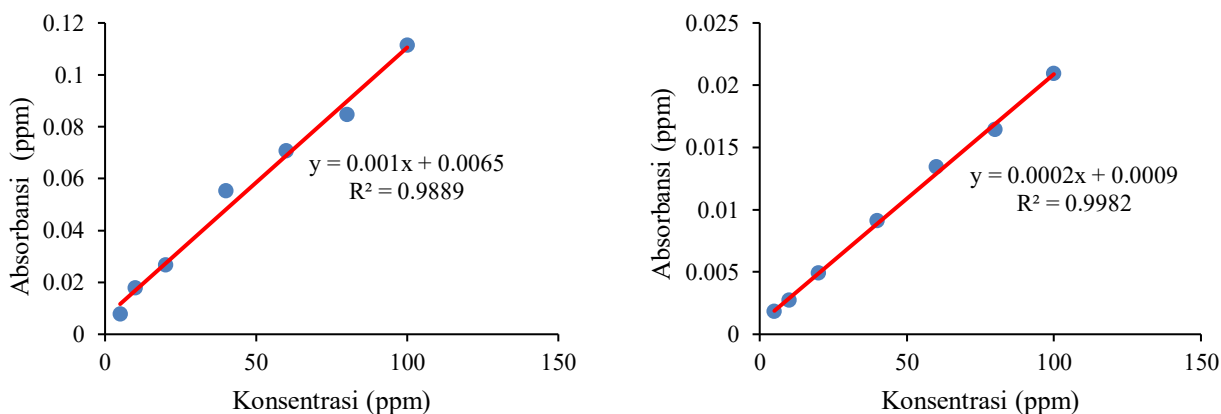
Pertumbuhan vegetatif yang optimal menunjukkan bahwa tanaman memiliki kapasitas fotosintetik yang tinggi, artinya, bahan baku untuk metabolisme sekunder juga tinggi.

Total Fenolik dan Flavonoid

Analisis ini dilakukan untuk menentukan kadar total fenolik dan total flavonoid dalam ekstrak berdasarkan persamaan kurva standar. Kurva standar disusun menggunakan asam galat sebagai standar fenolik dan rutin sebagai standar flavonoid. Kedua kurva menunjukkan hubungan linear antara konsentrasi larutan standar dan nilai absorbansi yang terukur (Gambar 1). Persamaan regresi linear asam galat dan rutin masing-masing adalah $y = 0.001x + 0.0065$ ($R^2 = 0.9889$) dan $y = 0.0002x + 0.0009$ ($R^2 = 0.9982$). Nilai koefisien determinasi (R^2) yang mendekati 1 menunjukkan linearitas yang sangat baik, sehingga persamaan regresi tersebut layak digunakan untuk menghitung kadar total fenolik dan total flavonoid.

Koefisien determinasi (R^2) di atas 0.98 dalam kurva kalibrasi spektrofotometri UV-Vis menunjukkan linearitas yang sangat baik. Hasil ini menunjukkan bahwa absorbansi dan konsentrasi memiliki korelasi yang sangat kuat (Asmorowati & Lindawati, 2019). Korelasi yang mendekati 1 menunjukkan bahwa kesalahan acak sangat kecil dan kurva kalibrasi dapat digunakan untuk penentuan sampel.

Senyawa metabolit termasuk senyawa fenolik dan flavonoid merupakan kelompok besar senyawa alami yang strukturnya beragam, disintesis melalui jalur biokimia khusus (jalur metabolisme sekunder) yang bercabang dari jalur metabolisme primer (seperti jalur shikimat, jalur mevalonat, atau jalur poliketida) (Seigler, 2012). Jumlah dan jenis senyawa metabolit sangat bervariasi antar spesies, varietas, kondisi pertumbuhan, dan respons terhadap stres.



Gambar 1. Kurva standar asam galat dan rutin hydrate

Analisis kadar total fenolik penting dilakukan karena menggambarkan kapasitas antioksidan suatu sampel. Umumnya semakin tinggi kadar senyawa fenolik (sederhana seperti asam fenolat atau polifenol seperti flavonoid, antosianin, tanin), semakin tinggi pula aktivitas antioksidan yang dimilikinya. (Rafi *et al.*, 2012).

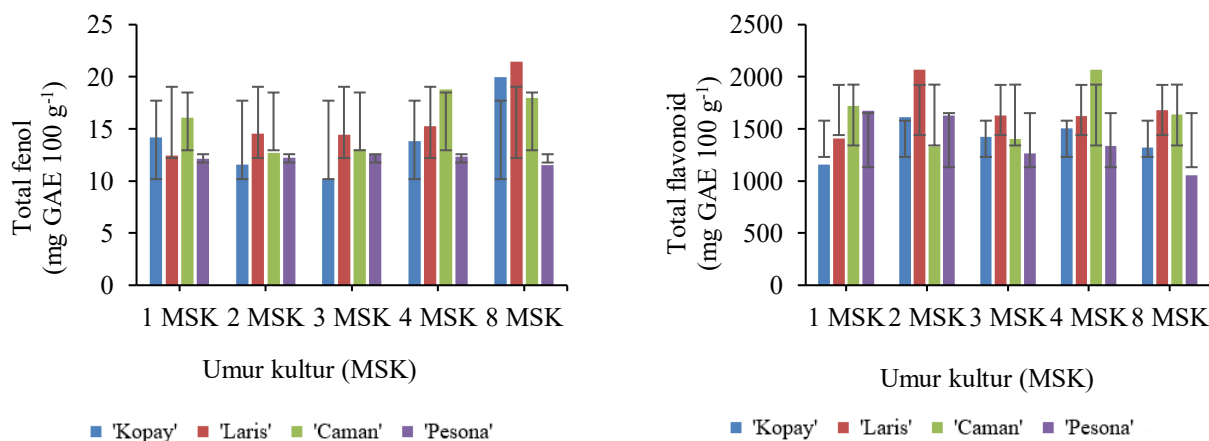
Pada Gambar 2, terlihat bahwa kadar total fenolik lebih besar dari total flavonoid karena flavonoid bagian dari senyawa fenolik. Senyawa fenolik merupakan kelompok besar senyawa yang terdapat pada tumbuhan. Kadar total fenolik dan flavonoid dari ekstrak daun *in vitro* cabai merah besar bervariasi antar varietas dan umur kultur. Pola perubahan kadar fenolik dan flavonoid tidak linier seiring bertambahnya umur kultur. Setiap varietas cabai memiliki tren peningkatan maupun penurunan total fenolik dan flavonoid yang berbeda, termasuk produksi total fenolik dan flavonoid tertinggi, misalnya total fenolik pada varietas 'Caman' tertinggi di umur 4 MSK (18.772 mg GAE 100 g⁻¹) dan pada varietas 'Laris' tertinggi di umur 8 MSK (21.433 mg GAE 100 g⁻¹). Untuk kadar total flavonoid pada varietas 'Kopay' tertinggi pada minggu kedua (1.612 mg RH 100 g⁻¹), kemudian menurun pada minggu selanjutnya hingga minggu kedelapan (1.323 mg RH 100 g⁻¹). Sementara itu, varietas 'Laris' memperlihatkan nilai tertinggi pada minggu kedua (2.069 mg RH 100 g⁻¹) dan cenderung tetap stabil hingga 8 MSK.

Pola akumulasi fenolik pada empat genotipe cabai menunjukkan bahwa umur kultur berperan penting dalam menentukan dinamika metabolit. Pada fase awal (1–3 MSK), kadar fenolik relatif stabil, mencerminkan fase adaptasi jaringan terhadap kondisi *in vitro*. Peningkatan signifikan muncul pada 4 MSK, terutama pada genotipe 'Laris' dan terutama Caman, yang menunjukkan aktivasi jalur fenilpropanoid sebagai bagian dari

mekanisme pertahanan. Hingga 8 MSK, 'Caman' tetap mempertahankan kadar fenolik tinggi, sedangkan 'Kopay', 'Laris', dan terutama 'Pesona' menunjukkan pola menurun atau moderat, yang kemungkinan berkaitan dengan oksidasi fenolik atau penurunan aktivitas metabolik pada kultur tua (Gambar 2A). Perbedaan ini menegaskan adanya variasi genetik dalam kapasitas biosintesis fenolik, dengan 'Caman' sebagai genotipe paling responsif.

Dinamika flavonoid mengikuti pola yang berbeda. Secara umum, akumulasi flavonoid meningkat pada fase awal kultur, terutama pada 1–2 MSK, yang menunjukkan tingginya aktivitas jalur fenilpropanoid pada fase proliferasi. Genotipe 'Caman' secara konsisten menghasilkan kadar flavonoid tertinggi pada hampir seluruh umur pengamatan, dengan puncak mendekati 2000 mg RH 100 g⁻¹ pada 4 MSK. 'Laris' menunjukkan pola relatif stabil dengan sedikit fluktuasi, sedangkan 'Kopay' dan 'Pesona' mengalami penurunan nyata setelah 2 MSK, terutama pada 8 MSK, yang mengindikasikan menurunnya aktivitas metabolik pada jaringan yang menua. Secara keseluruhan, umur 2–4 MSK merupakan fase paling optimal untuk akumulasi flavonoid, sedangkan 8 MSK menunjukkan penurunan pada semua genotipe (Gambar 2B).

Jika dibandingkan, kandungan total fenolik cenderung meningkat bersama umur kultur, terutama pada 4 dan 8 MSK, sedangkan kandungan flavonoid lebih dinamis dengan puncak pada 2–4 MSK dan penurunan pada kultur tua. Varietas 'Caman' menunjukkan akumulasi fenolik dan produksi flavonoid tertinggi pada umur kultur 4 MSK. Perbedaan ini mengindikasikan bahwa respons metabolik tanaman terhadap kondisi kultur *in vitro* bersifat genotipe-spesifik, yang diduga berkaitan dengan regulasi enzim fenilpropanoid berbeda antar varietas (Patel *et al.*, 2025).



Gambar 2. Total fenolik (A) dan total flavonoid (B) berdasarkan umur kultur. Batang vertikal menunjukkan nilai *standar error* (SE) dari tiga ulangan

Selain itu, fluktuasi kadar fenolik dan flavonoid seiring bertambahnya umur kultur dapat dipengaruhi oleh kondisi fisiologis jaringan, fase pertumbuhan eksplan, serta stres oksidatif yang terjadi selama kultur berlangsung, di mana produksi metabolit sekunder sering kali terinduksi pada fase maturasi atau stasioner (*stationary phase*) (Dixon & Paiva, 1995). Fase maturasi adalah fase pematangan secara fisiologis dimana sel-sel mencapai ukuran dan fungsi maksimumnya. Fase stasioner adalah fase dimana laju pertumbuhan melambat atau cenderung konstan karena energi yang dialihkan untuk fungsi yang lain seperti reproduksi, pembuahan atau pembungaan.

Selanjutnya dilakukan uji prasyarat analisis data, yaitu uji homogenitas varians, dilakukan menggunakan Levene's Test. Hasil uji menunjukkan bahwa nilai signifikansi (*p value*) yang diperoleh adalah 0.107. Karena nilai probabilitas tersebut lebih besar dari 0.05, maka dapat disimpulkan bahwa tidak terdapat perbedaan varians yang signifikan antar kelompok data. Dengan kata lain, data penelitian dianggap homogen atau memiliki varians yang setara (*equal variances assumed*), sehingga asumsi homogenitas terpenuhi dan analisis dilanjutkan dengan ANOVA dua arah.

Analisis ANOVA dua arah menunjukkan bahwa interaksi antara faktor varietas dan umur kultur berpengaruh nyata terhadap kadar total fenolik ($F(12, 40) = 2.157; \rho = 0.034$) (Tabel 4) dan total flavonoid ($F(12, 40) = 3.458; \rho = 0.002$) (Tabel 5). Hasil ini mengindikasikan bahwa pengaruh umur kultur terhadap akumulasi fenolik

dan flavonoid tidak bersifat seragam pada seluruh varietas. Dengan kata lain, respons masing-masing varietas terhadap perubahan umur kultur berbeda-beda, sehingga kandungan fenolik dan flavonoid yang terbentuk bergantung pada interaksi antara faktor genetik dan fase perkembangan kultur. Temuan ini sejalan dengan Martínez-Silvestre *et al.* (2022) yang melaporkan bahwa akumulasi metabolisme dipengaruhi oleh status fisiologis jaringan selama perkembangan kultur *in vitro*. Oleh karena itu, optimasi akumulasi senyawa bioaktif pada kultur *in vitro* cabai merah memerlukan pemilihan varietas serta penentuan umur kultur yang tepat.

Selain interaksi, faktor tunggal varietas juga berpengaruh signifikan terhadap kadar total fenolik ($F(3, 40) = 5.616; \rho = 0.003$) dan total flavonoid ($F(3, 40) = 6.213; \rho = 0.001$). Hal ini menunjukkan adanya perbedaan kemampuan produksi fenolik dan flavonoid antar varietas cabai yang diuji. Kandungan fenolik dan flavonoid diketahui bersifat *genotype-dependent*, yang menunjukkan bahwa faktor genetik berperan penting dalam menentukan kapasitas akumulasi metabolit sekunder tanaman. Perbedaan tersebut diduga berkaitan dengan variasi genetik yang memengaruhi ekspresi atau aktivitas enzim-enzim kunci pada jalur biosintesis fenilpropanoid dan flavonoid, seperti *phenylalanine ammonia-lyase* (PAL) dan *chalcone synthase* (CHS), serta mekanisme regulasi biosintesis metabolit sekunder pada masing-masing varietas. Selanjutnya, faktor umur kultur juga berpengaruh nyata terhadap kadar total fenolik ($F(4, 40) = 7.214; \rho < 0.001$) dan total flavonoid ($F(4, 40) = 2.665; \rho = 0.046$).

Tabel 4. Analisis ragam ANOVA kadar total fenolik berdasarkan umur kultur, varietas cabai dan interaksinya

Sumber keragaman	df	Mean square	F	Sig.
Varietas	3	41.751	5.616	0.003
Umur kultur	4	53.631	7.214	0.000
Varietas*umur kultur	12	16.036	2.157	0.034
Error	40	7.435		

Keterangan: R Squared = 0.642 (Adjusted R Squared = 0.471).

Tabel 5. Analisis ragam ANOVA kadar total flavonoid berdasarkan umur kultur, varietas cabai dan interaksinya

Sumber keragaman	df	Mean square	F	Sig.
Varietas	3	0.347	6.213	0.001
Umur kultur	4	0.149	2.665	0.046
Varietas*umur kultur	12	0.193	3.458	0.002
Error	40	0.056		
Total	60			

Keterangan: R Squared = 0.639 (Adjusted R Squared = 0.468).

Hasil ini menunjukkan bahwa umur kultur berhubungan erat dengan perubahan metabolisme seluler dan fase pertumbuhan kultur, seperti fase adaptasi, maturasi atau stres. Akumulasi metabolit sekunder, termasuk fenolik dan flavonoid, umumnya meningkat pada kondisi stres fisiologis atau fase maturasi jaringan, yang menjelaskan adanya perbedaan signifikan antar periode waktu pengamatan.

Hasil ANOVA menunjukkan bahwa umur kultur berpengaruh signifikan terhadap kadar total fenolik dan total flavonoid ($p < 0.05$) (Tabel 6). Kadar total fenolik berkisar antara 12.563 – 17.728 mg GAE 100 g⁻¹ sampel, sedangkan kadar total flavonoid berkisar antara 1.425 – 1.661 mg RH 100 g⁻¹ sampel.

Hasil uji lanjut Tukey HSD untuk total fenolik (Tabel 6) terlihat adanya perbedaan nyata antar kelompok perlakuan. Untuk kadar total fenolik berdasarkan umur kultur 1, 2, 3, dan 4 MSK tidak berbeda signifikan secara statistik. Kadar total fenolik tertinggi terdapat pada saat umur kultur 8 MSK, yaitu 17.728 mg GAE 100 g⁻¹ sampel dan berbeda signifikan secara statistik dibandingkan dengan umur kultur 1, 2, dan 3 MSK. Secara umum, terjadi peningkatan kadar total fenolik seiring bertambahnya umur kultur. Kandungan tertinggi pada 8 MSK menunjukkan bahwa fase stasioner atau akhir fase log kultur adalah periode optimal akumulasi senyawa fenolik.

Berbeda dengan kadar total fenolik, hasil uji Tukey HSD untuk kadar total flavonoid menunjukkan hasil yang lebih homogen. Semua umur kultur (1, 2, 3, 4, 8 MSK) memiliki notasi huruf yang sama (a), menunjukkan bahwa tidak

terdapat perbedaan signifikan secara statistik dalam kadar total flavonoid di antara semua periode pengamatan (Tabel 6). Meskipun terdapat sedikit fluktuasi nilai rata-rata (tertinggi pada 2 MSK dan terendah pada 8 MSK), perbedaan ini tidak cukup besar untuk dianggap nyata ($p > 0.05$). Hal ini mengindikasikan bahwa akumulasi senyawa flavonoid pada kultur ini relatif stabil dan tidak terlalu dipengaruhi oleh umur kultur dalam rentang waktu 1 hingga 8 MSK.

Hasil uji ANOVA berdasarkan varietas yang diuji menunjukkan adanya pengaruh signifikan ($p < 0.05$) terhadap kadar senyawa fenolik dan flavonoid (Tabel 7). Kisaran kadar total fenolik yang diamati adalah 12.171–15.712 mg GAE 100 g⁻¹ sampel, sedangkan total flavonoid berkisar antara 1.393–1.681 mg RH 100 g⁻¹ sampel.

Analisis berdasarkan varietas menunjukkan bahwa ‘Caman’ dan ‘Laris’ memiliki kadar fenolik yang lebih tinggi, masing-masing sebesar 15.712 dan 15.614 mg GAE 100 g⁻¹ sampel, serta berada dalam kelompok huruf b. Hal ini menunjukkan bahwa kedua varietas tersebut tidak berbeda nyata satu sama lain, tetapi berbeda nyata dibandingkan varietas lainnya (Tabel 7). Tingginya kandungan fenolik pada kedua varietas tersebut mengindikasikan potensi kontribusi yang lebih besar terhadap kapasitas antioksidan, mengingat senyawa fenolik merupakan salah satu komponen utama penyumbang sifat antioksidan pada tanaman. Sebaliknya, varietas ‘Pesona’ memiliki kadar total fenolik terendah, yaitu 12.171 mg GAE 100 g⁻¹ sampel, sehingga berbeda nyata dengan varietas ‘Caman’ dan ‘Laris’.

Tabel 6. Pengaruh umur kultur terhadap kadar fenolik dan flavonoid

Umur kultur (MSK)	Kadar total fenolik (mg GAE 100 g ⁻¹ sampel) ± standar error	Kadar total flavonoid (mg GAE 100 g ⁻¹ sampel) ± standar error
1	13.666 ± 0.787 a	1.503 ± 0.068 a
2	12.824 ± 0.787 a	1.661 ± 0.068 a
3	12.563 ± 0.787 a	1.430 ± 0.068 a
4	15.038 ± 0.787 ab	1.633 ± 0.068 a
8	17.728 ± 0.787 b	1.425 ± 0.068 a

Keterangan: p* signifikan pada $p < 0.05$; huruf yang sama pada baris yang sama menyatakan tidak berbeda nyata hasil uji lanjut Tukey HSD.

Tabel 7. Pengaruh varietas cabai terhadap kadar fenolik dan flavonoid berdasarkan varietas cabai

Varietas	Kadar total fenolik (mg GAE 100 g ⁻¹ sampel) ± standar error	Kadar total flavonoid (mg RH 100 g ⁻¹ sampel) ± standar error
‘Kopay’	13.959 ± 0.704 ab	1.406 ± 0.061 a
‘Laris’	15.614 ± 0.704 b	1.681 ± 0.061 b
‘Caman’	15.712 ± 0.704 b	1.641 ± 0.061 b
‘Pesona’	12.171 ± 0.704 a	1.393 ± 0.061 a

Keterangan: p* signifikan pada $p < 0.05$; huruf yang sama pada baris yang sama menyatakan tidak berbeda nyata hasil uji lanjut Tukey HSD.

Perbedaan kandungan fenolik antar varietas ini diduga berkaitan dengan variasi genetik yang memengaruhi kapasitas biosintesis dan akumulasi senyawa fenolik melalui jalur fenilpropanoid.

Pola yang serupa juga terlihat pada kadar total flavonoid berdasarkan varietas. Varietas 'Laris' dan 'Caman' memiliki kadar flavonoid tertinggi (1.681 dan 1.641 mg RH 100 g⁻¹) dan dikelompokkan ke dalam huruf b, menunjukkan perbedaan signifikan dengan varietas 'Kopay' dan 'Pesona'. Hal ini menunjukkan bahwa kedua varietas tersebut secara konsisten memiliki kandungan metabolit sekunder yang lebih tinggi dibanding varietas lainnya.

Secara umum, hasil ini menunjukkan bahwa varietas 'Laris' dan 'Caman' memiliki potensi lebih baik sebagai sumber senyawa bioaktif, baik fenolik maupun flavonoid. Perbedaan antar varietas kemungkinan disebabkan oleh faktor genetik yang memengaruhi jalur biosintesis senyawa fenolik. Temuan ini sejalan dengan penelitian-penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa kandungan fenolik dan flavonoid sangat dipengaruhi oleh varietas dan kondisi tumbuh.

Berdasarkan parameter yang dianalisis pertumbuhan tanaman (tinggi dan jumlah daun), kandungan total fenolik, dan total flavonoid pada empat genotipe cabai ('Kopay', 'Laris', 'Caman', dan 'Pesona') pada berbagai umur kultur, terlihat bahwa umur kultur memberikan pengaruh signifikan terhadap dinamika fisiologis dan metabolisme sekunder tanaman. Pertumbuhan tinggi tanaman menunjukkan pola peningkatan konsisten dari 1 hingga 8 MSK pada seluruh genotipe, dengan 'Kopay' dan 'Caman' menampilkan pertumbuhan tertinggi pada fase lanjut. Jumlah daun juga meningkat secara bertahap, meskipun laju peningkatannya berbeda antar genotipe. 'Pesona', misalnya, menghasilkan jumlah daun tertinggi pada 8 MSK meskipun tinggi tanamannya tidak setinggi genotipe lain, menunjukkan adanya perbedaan strategi fisiologis dalam memanfaatkan fase perkembangan kultur. Secara keseluruhan, integrasi ketiga parameter ini mengindikasikan bahwa umur kultur 4 MSK merupakan fase paling optimal untuk aktivitas metabolisme sekunder, khususnya dalam akumulasi fenolik dan flavonoid, sekaligus masih berada pada fase pertumbuhan yang vigor. Pada fase ini, 'Caman' tampil sebagai genotipe paling unggul dengan pertumbuhan kuat, kandungan fenolik tinggi, serta akumulasi flavonoid yang maksimal. Sebaliknya, 'Pesona' menunjukkan pola metabolik berbeda, dengan akumulasi fenolik yang tinggi namun flavonoid yang rendah, menegaskan adanya variasi strategi adaptasi antar genotipe.

Temuan ini penting untuk menentukan waktu panen kultur serta memilih genotipe yang paling sesuai untuk produksi biomassa maupun studi metabolomik pada cabai *in vitro*.

Hubungan antara pertumbuhan tanaman *in vitro* dan akumulasi metabolit sekunder mencerminkan dinamika fisiologis yang kompleks selama perkembangan kultur. Peningkatan umur kultur dari 1 hingga 8 MSK berkorelasi dengan pertumbuhan tanaman yang terus meningkat (tinggi dan jumlah daun), tetapi pola akumulasi fenolik dan flavonoid tidak identik. Total fenolik meningkat tajam pada 4–8 MSK, terutama pada 'Caman' dan 'Pesona', yang kemungkinan terkait dengan meningkatnya stres oksidatif dan aktivasi jalur fenilpropanoid pada jaringan kultur yang menua. Fenolik berperan sebagai molekul pertahanan yang diproduksi lebih intens saat tanaman mengalami peningkatan ROS (*reactive oxygen species*) akibat kondisi kultur yang semakin padat atau tua (Kruk *et al.*, 2022; Tuladhar *et al.*, 2021). Sebaliknya, flavonoid mencapai puncak pada fase awal 2–4 MSK dan menurun pada 8 MSK, menandakan bahwa biosintesis flavonoid lebih aktif pada fase pertumbuhan vegetatif sebelum mengalami penurunan ketika kultur memasuki fase maturasi dan stres fisiologis meningkat. Penurunan ini mungkin disebabkan oleh menurunnya aktivitas enzim kunci seperti chalcone synthase (CHS) dan flavanone-3-hydroxylase (F₃H), sebagaimana dilaporkan pada kultur tanaman lain yang mengalami penuaan (Liu *et al.*, 2022; Shomali *et al.*, 2022). Kombinasi antara peningkatan fenolik dan penurunan flavonoid pada 8 MSK menunjukkan adanya pergeseran alokasi karbon metabolik, di mana tanaman lebih memprioritaskan sintesis senyawa fenolik pertahanan dibandingkan metabolit khusus seperti flavonoid. Pola fisiologis ini konsisten dengan pandangan bahwa fase pertumbuhan aktif (2–4 MSK) merupakan periode optimum untuk sintesis metabolit sekunder berkualitas tinggi, sedangkan fase penuaan lebih mengarah pada akumulasi metabolit stres (Salam *et al.*, 2023). Dengan demikian, integrasi ketiga parameter tersebut menunjukkan bahwa pertumbuhan, stres fisiologis, dan metabolisme sekunder saling berinteraksi erat dalam membentuk profil fenolik dan flavonoid pada tanaman cabai *in vitro*.

KESIMPULAN

Varietas 'Caman' dan 'Pesona' pada umur kultur yang sama yaitu 8 MSK merupakan varietas yang memiliki pertumbuhan vegetatif terbaik (tinggi tanaman tertinggi dan jumlah daun terbanyak). Umur kultur 4 MSK merupakan fase paling optimal untuk aktivitas metabolisme

sekunder, khususnya dalam akumulasi fenolik dan flavonoid. Varietas 'Caman' menghasilkan produksi total fenolik dan total flavonoid tertinggi pada umur 4 MSK, sehingga dapat dianggap sebagai varietas paling potensial untuk produksi metabolit sekunder. Temuan ini menegaskan pentingnya pemilihan varietas dan penentuan waktu umur kultur yang optimal dalam meningkatkan akumulasi senyawa bioaktif pada kultur *in vitro* cabai merah.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada seluruh pihak yang telah memberikan bantuan tenaga dan pikiran selama penelitian berlangsung. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada Komisi Pembimbing Tesis yang telah memberikan masukan dan perbaikan teknis hingga penelitian dapat diselesaikan.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad, N. I., Bunga, Y. N., & Bare, Y. (2021). Etnobotani Tanaman Cabai Merah Keriting (*Capsicum Annuum* L.) Di Desa Waiwuring, Kecamatan Witihama Kabupaten Flores Timur. *Spizaetus: Jurnal Biologi dan Pendidikan Biologi*, 2(2), 8-17. <https://doi.org/10.55241/spibio.v2i2.46>
- Alonso-Villegas, R., González-Amaro, R. M., Figueroa-Hernández, C. Y., & Rodríguez-Buenfil, I. M. (2023). The genus capsicum: a review of bioactive properties of its polyphenolic and capsaicinoid composition. *Molecules*, 28(10), 4239. <https://doi.org/10.3390/molecules28104239>
- Asra, R., & Rahma, S. (2021). Development and validation of spectrophotometric methods for quantitative determination of total phenolic and total flavonoid content of plant extracts. *Bulletin of Chemical Technologies*, 39(1), 25–28.
- Bozan, B., & Temelli, F. (2008). Chemical composition and oxidative stability of flax, safflower and poppy seed and seed oils. *Bioresource Technology*, 99(14), 6354-6359. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.12.009>
- Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M., & Chern, J. C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3). <https://doi.org/10.38212/2224-6614.2748>
- Dixon, R. A., & Paiva, N. L. (1995). Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *The Plant Cell*, 7(7), 1085. <https://doi.org/10.2307/3870059>
- Hemmati, N., Cheniany, M., & Ganjeali, A. (2020). Effect of plant growth regulators and explants on callus induction and study of antioxidant potentials and phenolic metabolites in *Salvia tebesana* Bunge. *Botanica Serbica*, 44(2), 163-173. <https://doi.org/10.2298/BOTSERB2002163H>
- Kebu, Z., Gure, A., & Molole, G. J. (2024). Total phenolic and flavonoid content, lipophilic components, and antioxidant activities of *Capsicum annum* varieties grown in Omo Nada, Jimma, Ethiopia. *Natural Product Communications*, 19(12), 1934578X241306244. <https://doi.org/10.1177/1934578X241306244>
- Kruk, J., Aboul-Enein, B. H., Duchnik, E., & Marchlewicz, M. (2022). Antioxidative properties of phenolic compounds and their effect on oxidative stress induced by severe physical exercise. *Journal of Physiological Sciences*, 72(1), Article 19. <https://doi.org/10.1186/s12576-022-00856-y>
- Kuljarusnont, S., Iwakami, S., Iwashina, T., & Tungmunnithum, D. D. (2024). Flavonoids and other phenolic compounds for physiological roles, plant species delimitation, and medical benefits: A promising view. *Molecules*, 29(22), 5351. <https://doi.org/10.3390/molecules29225351>
- Li, Y., D. Kong, Y. Fu, M.R. Sussman, H. Wu. 2020. The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 148, 80-89. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.01.006>
- Lingwan, M., Pradhan, A. A., Kushwaha, A. K., Dar, M. A., Bhagavatula, L., & Datta, S. (2023). Photoprotective role of plant secondary metabolites: Biosynthesis, photoregulation, and prospects of metabolic engineering for enhanced protection under excessive light. *Environmental and Experimental Botany*, 209, 105300. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2023.105300>
- Liu, W., Feng, Y., Yu, S., Fan, Z., Li, X., Li, J., & Yin, H. (2021). The flavonoid biosynthesis network in plants. *International journal of molecular sciences*, 22(23), 12824. <https://doi.org/10.3390/ijms222312824>

- Martínez-Silvestre, K. E., Santiz-Gómez, J. A., Luján-Hidalgo, M. C., Ruiz-Lau, N., Sánchez-Roque, Y., & Gutiérrez-Miceli, F. A. (2022). Effect of UV-B radiation on flavonoids and phenols accumulation in tempisque (*Sideroxylon capiri* Pittier) callus. *Plants*, 11(4), 473. <https://doi.org/10.3390/plants11040473>
- Materska, M., & Perucka, I. (2005). Antioxidant activity of the main phenolic compounds isolated from hot pepper fruit (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 5, 1750-1756. <https://doi.org/10.1021/jf035331k>
- Millah, Z. M., Syukur, M., Sobir, & Ardie, S. W. (2021). Metabolomic analyses to evaluate the effect of drought stress on chili pepper (*Capsicum annuum* L.) at vegetative stage. *Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences*, 111, 48-60. <https://doi.org/10.18551/rjoas.2021-03.07>
- Molla, M. R., Rohman, M. M., Islam, M. R., Hasanuzzaman, M., & Hassan, L. (2022). Screening and evaluation of chilli (*Capsicum annuum* L.) genotypes for waterlogging tolerance at seedling stage. *Biocell*, 46(7), 1613-1627. <https://doi.org/10.32604/biocell.2022.019243>
- Monfort, L. E. F., Bertolucci, S. K. V., Lima, A. F., de Carvalho, A. A., Mohammed, A., Blank, A. F., & Pinto, J. E. B. (2018). Effects of plant growth regulators, different culture media and strength MS on production of volatile fraction composition in shoot cultures of *Ocimum basilicum*. *Industrial Crops and Products*, 116, 231-239. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.02.075>
- Nikolaeva, T. N., Lapshin, P. V., & Zagorskina, N. V. (2022). Method for determining the total content of phenolic compounds in plant extracts with Folin Denis reagent and Folin-Ciocalteu reagent: Modification and comparison. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 48(7), 1519-1525. <https://doi.org/10.1134/S1068162022070214>
- North, J., Patrick, N., & Laubscher, C. (2012). Effects of antioxidants, plant growth regulators and wounding on phenolic compound excretion during micropropagation of *Strelitzia reginae*. *International Journal of Physical Sciences*, 7(4), 638-646. <https://doi.org/10.5897/IJPS11.786>
- Patel, P., Prasad, A., Srivastava, D., Niranjana, A., Saxena, G., Singh, S. S., Misra, P., & Chakrabarty, D. (2022). Genotype-dependent and temperature-induced modulation of secondary metabolites, antioxidative defense and gene expression profile in *Solanum viarum* Dunal. *Environmental and Experimental Botany*, 194, 104686. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2021.104686>
- Permadi, N., Akbari, S. I., Prismantoro, D., Indriyani, N. N., Nurzaman, M., Alhasnawi, A. N., Doni, F., & Julaeha, E. (2024). Traditional and next-generation methods for browning control in plant tissue culture: Current insights and future directions. *Current Plant Biology*, 38, 100339. <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2024.100339>
- Pertamawati. (2010). Pengaruh fotosintesis terhadap pertumbuhan tanaman kentang (*Solanum tuberosum* L.) dalam lingkungan fotoautotrop secara in vitro. *Jurnal Sains dan Teknologi Indonesia*, 12(1), 31-37. <https://doi.org/10.29122/jsti.v12i1.848>
- Pothitirat, W., Chomnawang, T. M., Supabphol, R., & Gritsanapan, W. (2009). Comparison of bioactive compounds content, free radical scavenging and anti-acne inducing bacteria activities of extracts from the mangosteen fruit rind at two stages of maturity. *Fitoterapia*, 80, 442-444. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2009.06.005>
- Rafi, M., Widyastuti, N., Suradikusumah, E., & Darusman, L. K. (2012). Aktivitas antioksidan, kadar fenol dan flavonoid total dari enam tumbuhan obat Indonesia. *Jurnal Bahan Alam Indonesia*, 8(3), 159-165.
- Ribes-Moya, A. M., Adalid, A. M., Raigón, M. D., Hellín, P., Fita, A., & Rodríguez-Burruezo, A. (2020). Variation in flavonoids in a collection of peppers (*Capsicum* sp.) under organic and conventional cultivation: Effect of the genotype, ripening stage, and growing system. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(5), 2208-2223. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10245>
- Salam, U., Ullah, S., Tang, Z. H., Elateeq, A. A., Khan, Y., Khan, J., Khan, A., & Ali, S. (2023). Plant metabolomics: An overview of the role of primary and secondary metabolites against different environmental stress factors. *Life (Basel)*, 13(3), 706. <https://doi.org/10.3390/life13030706>
- Seigler, D. S. (2012). *Plant secondary metabolism*. Springer Science & Business Media.

- Sharma, A., Shahzad, B., Rehman, A., Bhardwaj, R., Landi, M., & Zheng, B. (2019). Response of phenylpropanoid pathway and the role of polyphenols in plants under abiotic stress. *Molecules*, 24(13), 2452. <https://doi.org/10.3390/molecules24132452>
- Shomali, A., Das, S., Arif, N., Sarraf, M., Zahra, N., Yadav, V., Aliniaiefard, S., Chauhan, D. K., & Hasanuzzaman, M. (2022). Diverse physiological roles of flavonoids in plant environmental stress responses and tolerance. *Plants*, 11(22), 3158.
- Sun, W., & Shahrajabian, M. H. (2023). Therapeutic potential of phenolic compounds in medicinal plants—Natural health products for human health. *Molecules*, 28(4), 1845. <https://doi.org/10.3390/molecules28041845>
- Tuladhar, P., Sasidharan, S., & Saudagar, P. (2021). Role of phenols and polyphenols in plant defense response to biotic and abiotic stresses. In S. Jogaiah (Ed.), *Biocontrol agents and secondary metabolites* (pp. 419–441). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822919-4.00017-X>
- Villa-Rivera, M. G., & Ochoa-Alejo, N. (2021). Transcriptional regulation of ripening in chili pepper fruits (*Capsicum* spp.). *International Journal of Molecular Sciences*, 22(22), 12151. <https://doi.org/10.3390/ijms222212151>
- Vongsak, B., Sithisarn, P., Mangmool, S., Thongpraditchote, S., Wongkrajang, Y., & Gritsanapan, W. (2013). Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaf extract by the appropriate extraction method. *Industrial Crops and Product*, 44, 566–571. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.09.021>
- Wang, S. Y., & Zheng, W. (2001). Effect of plant growth temperature on antioxidant capacity in strawberry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 4977–4982. <https://doi.org/10.1021/jf0106244>
- Weremczuk-Jeżyna, I., Kuźma, L., & Grzegorzczak, I. (2021). The effect of different light treatments on morphogenesis, phenolic compound accumulation and antioxidant potential of *Dracocephalum forrestii* transformed shoots cultured in vitro. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 224, 112329. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2021.112329>
- Zein El Din, A. F., Darwesh, R. S., Ibrahim, M. F., Salama, G. M., Shams El-Din, I. M., Abdelaal, W. B., Ali, G. A., Elsayed, M. S., Ismail, I. A., & Abdellatif, Y. M. (2022). Antioxidants application enhances regeneration and conversion of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) somatic embryos. *Plants*, 11(15), 2023. <https://doi.org/10.3390/plants11152023>