

**PENGARUH PEMBERIAN ZAT PENGATUR TUMBUH (ZPT) NAA DAN
BAP TERHADAP INDUKSI KALUS TANAMAN INSULIN (*Thitonia
diversifolia* (Hemsl)) SECARA IN VITRO**

SKRIPSI



**UIN SUNAN AMPEL
S U R A B A Y A**

Disusun Oleh:

RIDA NUR ROHMA

NIM: H71218027

**PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI SUNAN AMPEL
SURABAYA**

2022

PERNYATAAN KEASLIAN

PERNYATAAN KEASLIAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini,

Nama : Rida Nur Rohma

NIM : H71218027

Program Studi : Biologi

Angkatan : 2018

Menyatakan bahwa saya tidak melakukan plagiat dalam penulisan skripsi saya yang berjudul: "PENGARUH PEMBERIAN ZAT PENGATUR TUMBUH (ZPT) NAA DAN BAP TERHADAP INDUKSI KALUS TANAMAN INSULIN (*Thitonia diversifolia* (Hemsl) SECARA IN VITRO". Apabila suatu saat nanti terbukti saya melakukan tindakan plagiat, maka saya bersedia menerima sanksi yang telah ditetapkan.

Demikian pernyataan keaslian ini saya buat dengan sebenar-benarnya.

Surabaya, 5 Agustus 2022

Yang menyatakan,



Rida Nur Rohma

NIM. H71218027

HALAMAN PERSETUJUAN

Skripsi

**PENGARUH PEMBERIAN ZAT PENGATUR TUMBUH (ZPT) NAA DAN
BAP TERHADAP INDUKSI KALUS TANAMAN INSULIN (*Thitonia
diversifolia* (Hemsl)) SECARA IN VITRO**

Diajukan Oleh:

RIDA NUR ROHMA

NIM: 1171218027

Telah diperiksa dan disetujui

Di Surabaya, 05 Agustus 2022

Dosen Pembimbing Utama

Dosen Pembimbing Pendamping



Esti Tyastirin, M. KM
NIP. 198706242014032001



Hanik Faizah, S.Si., M.Si
NUP. 201409019

PENGESAHAN TIM PENGUJI SKRIPSI
PENGESAHAN TIM PENGUJI SKRIPSI

Skripsi Rida Nur Rohma ini telah dipertahankan
di depan tim penguji skripsi
di Surabaya, 08 Agustus 2022

Mengesahkan,
Dewan Penguji

Penguji I



Esti Tyastirin, M. KM
NIP. 198706242014032001

Penguji II



Hanik Faizah, S.Si., M.Si
NUP. 201409019

Penguji III



Drs. Abdul Manan, M.Pd.I.,
NIP.197006101998031002

Penguji IV



Risa Purnamasari, S.Si., M.Si
NUP. 201409002

Mengetahui,



Abdul Hafid Hamdani, M.Pd.
NIP. 196507312000031002

LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI



**KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI SUNAN AMPEL SURABAYA
PERPUSTAKAAN**

*Jl. Jend. A. Yani 117 Surabaya 60237 Telp. 031-8431972 Fax.031-8413300
E-Mail: perpustakaan@uinsby.ac.id*

LEMBAR PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

Sebagai sivitas akademika UIN Sunan Ampel Surabaya, yang bertanda tangan di bawah ini, saya:

Nama : Rida Nur Rohma
NIM : H71218027
Fakultas/Jurusan : Sains dan Teknologi / Biologi
E-mail address : ridarohma2000@gmail.com

Demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Perpustakaan UIN Sunan Ampel Surabaya, Hak Bebas Royalti Non-Eksklusif atas karya ilmiah :

Skripsi Tesis Desertasi Lain-lain (.....)
yang berjudul :

PENGARUH PEMBERIAN ZAT PENGATUR TUMBUH (ZPT) NAA DAN BAP

TERHADAP INDUKSI KALUS TANAMAN INSULIN (*Thitonia diversifolia* (Hemsl))

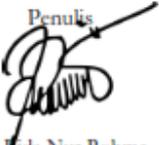
SECARA IN VITRO

beserta perangkat yang diperlukan (bila ada). Dengan Hak Bebas Royalti Non-Eksklusif ini Perpustakaan UIN Sunan Ampel Surabaya berhak menyimpan, mengalih-media/format-kan, mengelolanya dalam bentuk pangkalan data (database), mendistribusikannya, dan menampilkan/mempublikasikannya di Internet atau media lain secara **fulltext** untuk kepentingan akademis tanpa perlu meminta ijin dari saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan atau penerbit yang bersangkutan.

Saya bersedia untuk menanggung secara pribadi, tanpa melibatkan pihak Perpustakaan UIN Sunan Ampel Surabaya, segala bentuk tuntutan hukum yang timbul atas pelanggaran Hak Cipta dalam karya ilmiah saya ini.

Demikian pernyataan ini yang saya buat dengan sebenarnya.

Surabaya, 08 Agustus 2022

Penulis

(Rida Nur Rohma)

ABSTRAK

PENGARUH PEMBERIAN ZAT PENGATUR TUMBUH (ZPT) NAA DAN BAP TERHADAP INDUKSI KALUS TANAMAN INSULIN (*Thitonia diversifolia* (Hemsl)) SECARA IN VITRO

Tanaman insulin (*Tithonia diversifolia* (Hemsl)) tergolong dalam tanaman obat yang memiliki berbagai manfaat salah satunya dapat digunakan sebagai obat antidiabetes. Beberapa kandungan senyawa terdapat didalam tanaman insulin diantara lain *phenol*, *chlorogenic*, *ferulic*, dan *flavonoid*. Mengingat banyaknya manfaat yang dimiliki oleh tanaman ini, kultur jaringan menjadi alternatif dalam memperbanyak tanaman ini dengan menggunakan berbagai konsentrasi zat pengatur tumbuh. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui kombinasi pengaruh variasi konsentrasi BAP dan NAA terhadap induksi kalus tanaman insulin serta kombinasi variasi konsentrasi yang optimal dalam induksi kalus tanaman insulin (*Thitonia diversifolia* (Hemsl)). Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 9 perlakuan. Eksplan yang digunakan yaitu bagian daun muda tanaman insulin (*Thitonia diversifolia* (Hemsl)). Eksplan ditanam pada media MS serta variasi kombinasi konsentrasi zat pengatur tumbuh NAA (*Naphthalene Acetic Acid*) (0ppm; 2ppm; 4ppm; dan 6ppm) dan BAP (*Benzyl Amino Purine*) (0ppm; 0,5ppm; 1,5ppm; dan 1ppm). Setelah 4 minggu, dilakukan pemanenan dan pengamatan morfologi kalus, berat basah, kering kalus dan anatomi kalus. Data waktu pembentukan, berat basah dan kering dianalisis menggunakan *Uji Kruskal Wallis* dan *Uji Mann-Whitney*. Sedangkan data morfologi dan anatomi dianalisis secara deskriptif. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kalus yang dihasilkan dominan memiliki warna putih kehijauan dengan tekstur kalus yang remah. Hasil *Uji Mann-Whitney* memiliki perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) pada parameter hasil waktu pembentukan kalus dan berat kering kalus. Pada parameter waktu pembentukan kalus nilai rata-rata tertinggi ada pada perlakuan NAA 4ppm dan BAP 1ppm yakni 14,3 HST. 1,5322 gram pada perlakuan NAA 4ppm dan BAP 0,5ppm pada parameter berat basah kalus, sedangkan untuk berat kering terletak pada perlakuan NAA 6ppm dan Bap 1,5ppm yaitu sebesar 0,2524 gram.

Kata kunci: *Benzyl Amino Purine*, Induksi Kalus, Kultur *In Vitro*, *Naphthalene Acetic Acid*, Tanaman Insulin

ABSTRACT

THE EFFECT OF ADMINISTRATION OF GROWTH REGULATORY SUBSTANCES (ZPT) NAA AND BAP ON INDUCTION OF INSULIN PLANT CALLUS (*Thitonia diversifolia* (Hemsl)) IN VITRO

*Insulin plants (*Thitonia diversifolia* (Hemsl)) are classified as medicinal plants that have various benefits, one of which can be used as an antidiabetic drug. Some of the compounds contained in the insulin plant include phenol, chlorogenic, ferulic, and flavonoids. Given the many benefits possessed by this plant, tissue culture is an alternative in multiplying this plant by using various concentrations of growth regulators. The purpose of this study was to determine the combined effect of variations in BAP and NAA concentrations on callus induction of insulin plants and the optimal combination of concentration variations in callus induction of insulin plants (*Thitonia diversifolia* (Hemsl)). This research is an experimental research using Completely Randomized Design (CRD) method with 9 treatments. The explants used were the young leaves of the insulin plant (*Thitonia diversifolia* (Hemsl)). Explants were grown on MS media and various combinations of concentrations of growth regulators NAA (Naphthalene Acetic Acid) (0ppm; 2ppm; 4ppm; and 6ppm) and BAP (Benzyl Amino Purine) (0ppm; 0.5ppm; 1.5ppm; and 1ppm) After 4 weeks, harvesting and observation of callus morphology, wet weight, callus dry and callus anatomy were carried out. Data formation time, wet and dry weight were analyzed using the Kruskal-Wallis test and the Mann-Whitney test. Meanwhile, morphological and anatomical data were analyzed descriptively. The results showed that the dominant callus produced was greenish-white in color with a crumbly callus texture. The results of the Mann-Whitney test had a significant difference ($p < 0.05$) on the parameters of callus formation time and callus dry weight. In the callus formation time parameter, the highest average value was in the treatment NAA 4ppm and BAP 1ppm, namely 14.3 DAP. 1.5322 grams at 4ppm NAA treatment and 0.5ppm BAP on callus wet weight parameters, while for dry weight it is located at 6ppm NAA treatment and 1.5ppm BAP which is 0.2524 grams.*

Keywords: *Benzyl Amino Purine, Callus Induction, In Vitro Culture, Naphthalene Acetic Acid, Plant Insulin*

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL	ii
HALAMAN PERSETUJUAN	iii
PENGESAHAN TIM PENGUJI SKRIPSI	iv
PERNYATAAN KEASLIAN	v
MOTTO	vi
HALAMAN PERSEMBAHAN	vii
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI	vii
ABSTRAK	viii
ABSTRACT	vii
KATA PENGANTAR	viii
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah.....	7
1.3 Tujuan Penelitian	7
1.4 Manfaat Penelitian	8
1.5 Batasan Penelitian.....	8
1.6 Hipotesis Penelitian	9
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	10
2.1 Deskripsi Tanaman Insulin (<i>Tithonia diversifolia</i> (Hemsl.) A. Gray)	10
2.2 Klasifikasi Tanaman Insulin (<i>Tithonia diversifolia</i> (Hemsl.) A. Gray)	11
2.3 Kandungan dan Manfaat Tanaman Insulin (<i>Tithonia diversifolia</i> (Hemsl.) A. Gray).....	11
2.4 Deskripsi Teknik Kultur Jaringan	12
2.5 Tipe Kultur Jaringan.....	16
2.6 Kultur Kalus	17
2.7 Zat Pengatur Tumbuh (ZPT)	20

2.8 NAA (<i>Naphthalene Acetic Acid</i>)	21
2.9 BAP (<i>6-Benzylaminopurine</i>)	22
BAB III METODE PENELITIAN	24
3.1 Rancangan Penelitian	24
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian	25
3.3 Alat dan Bahan Penelitian	25
3.3.1 Alat	25
3.3.2 Bahan	25
3.4 Variabel Penelitian	26
3.5 Prosedur Penelitian	26
3.5.1 Sterilisasi Alat	26
3.5.2 Pembuatan Larutan Stok Zat Pengatur Tumbuh NAA	27
3.5.3 Pembuatan Larutan Stok Zat Pengatur Tumbuh BAP	27
3.5.4 Pembuatan Media	27
3.5.5 Sterilisasi Ruang Tanam	28
3.5.6 Sterilisasi Eksplan	29
3.5.7 Penanaman Eksplan	29
3.5.8 Tahap Pemeliharaan	30
3.5.9 Paramater Pengamatan	30
3.6 Analisis Data	31
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	32
4.1 Pengaruh Kombinasi Variasi Konsentrasi Zat Pengatur Tumbuh NAA (<i>Naphthalene Acetic Acid</i>) dan BAP (<i>Benzyl Amino Purine</i>) Terhadap Induksi Kalus Tanaman Insulin (<i>Tithonia diversifolia</i> (Hemsl.) A. Gray)	32
4.1.1 Waktu Pembentukan Kalus	34
4.1.2 Morfologi Kalus	41
4.1.3 Anatomi Kalus	47
4.1.4 Berat Basah Kalus	49
4.1.5 Berat Kering Kalus	52
BAB V PENUTUP	59
5.1 Kesimpulan	59
5.2 Saran	59

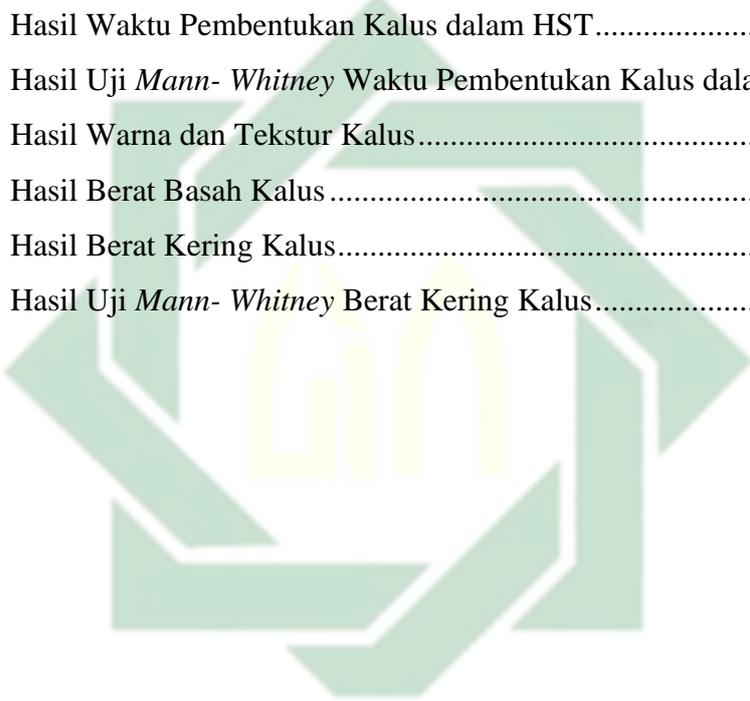
DAFTAR PUSTAKA.....	61
LAMPIRAN.....	68



UIN SUNAN AMPEL
S U R A B A Y A

DAFTAR TABEL

Tabel 3.1 Rancangan Penelitian	25
Tabel 3.2 Jadwal Pelaksanaan Penelitian	26
Tabel 4.1 Hasil Penelitian Pengaruh Kombinasi Variasi Konsentrasi Zat Pengatur Tumbuh NAA (<i>Naphthalene Acetic Acid</i>) dan BAP (<i>Benzyl Amino Purine</i>) Terhadap Induksi Kalus Tanaman Insulin (<i>Thitonia diversifolia</i> (Hemsl) A. Gray)	33
Tabel 4.2 Hasil Waktu Pembentukan Kalus dalam HST.....	37
Tabel 4.3 Hasil Uji <i>Mann-Whitney</i> Waktu Pembentukan Kalus dalam HST.....	38
Tabel 4.4 Hasil Warna dan Tekstur Kalus.....	43
Tabel 4.5 Hasil Berat Basah Kalus	50
Tabel 4.6 Hasil Berat Kering Kalus.....	54
Tabel 4.7 Hasil Uji <i>Mann-Whitney</i> Berat Kering Kalus.....	55



UIN SUNAN AMPEL
S U R A B A Y A

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Tanaman insulin (<i>Tithonia diversifolia</i> (Hemsl.) A. Gray)	10
Gambar 2.2	Struktur <i>Naphthalene Acetic Acid</i> (Shifeng et al., 2014).....	22
Gambar 2.3	Struktur <i>6-Benzylaminopurine</i> (Silva, 2012).....	24
Gambar 4.1	Kalus Tanaman Insulin	36
Gambar 4.2	Grafik Rata-Rata Waktu Pembentukan Kalus	41
Gambar 4.3	Kalus Tanaman Insulin <i>Thitonia diversifolia</i> (hemsl) yang telah berumur 4 minggu.....	43
Gambar 4.4	Struktur Anatomi Kalus Daun Insulin Menggunakan Perbesaran 100x	49
Gambar 4.5	Grafik Rata-Rata Berat Basah Kalus	51
Gambar 4.6	Grafik Rata-Rata Berat Kering Kalus	56



UIN SUNAN AMPEL
S U R A B A Y A

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Komposisi Media MS (<i>Murashige & Skoog</i>) M519	69
Lampiran 2. Alat-Alat Penelitian	70
Lampiran 3. Bahan-Bahan Penelitian	72
Lampiran 4. Kegiatan Penelitian.....	74
Lampiran 5. Gambar Hasil Penelitian Kalus Tanaman Insulin.....	75
Lampiran 6. Gambar Hasil Penimbangan Berat Basah Kalus Tanaman Insulin ...	78
Lampiran 7. Gambar Hasil Penimbangan Berat Kering Kalus Tanaman Insulin ..	81
Lampiran 8. Perhitungan Pembuatan Larutan NaOH dan HCl.....	84
Lampiran 9. Perhitungan Pembuatan Media.....	86
Lampiran 10. Perhitungan Pembuatan Larutan Stok Hormon.....	87
Lampiran 11. Perhitungan Pengambilan Larutan Stok Hormon.....	88
Lampiran 12. Hasil Uji Normalitas Data Waktu Pembentukan Kalus	90
Lampiran 13. Hasil Uji Homogenitas Data Waktu Pembentukan Kalus	91
Lampiran 14. Hasil Uji <i>Kruskal Wallis</i> Data Waktu Pembentukan Kalus	92
Lampiran 15. Hasil Uji Normalitas Data Hasil Berat Basah Kalus	93
Lampiran 16. Hasil Uji Homogenitas Data Hasil Berat Basah Kalus.....	94
Lampiran 17. Hasil Uji <i>Kruskal Wallis</i> Data Hasil Berat Basah Kalus	95
Lampiran 18. Hasil Uji Normalitas Data Hasil Berat Kering Kalus.....	96
Lampiran 19. Hasil Uji Homogenitas Data Hasil Berat Kering Kalus	97
Lampiran 20. Hasil Uji <i>Kruskal Wallis</i> Data Hasil Berat Kering Kalus.....	98

UIN SUNAN AMPEL
S U R A B A Y A

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Keanekaragaman hayati di Indonesia memiliki berbagai potensi yang dapat digunakan sebagai bahan obat. Secara turun-temurun, masyarakat memanfaatkan tanaman obat untuk menjaga, mencegah serta mengobati penyakit. Hal tersebut menunjukkan bahwa Allah SWT menciptakan segala sesuatu dimuka bumi ini tidak ada yang sia-sia, melainkan terdapat manfaat yang terkandung didalamnya. Sebagaimana firman Allah SWT dalam QS. Al – An'am (6): 99 sebagai berikut:

وَهُوَ الَّذِي أَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَخْرَجْنَا بِهِ نَبَاتَ كُلِّ شَيْءٍ فَأَخْرَجْنَا مِنْهُ خَضِرًا نُخْرَجُ مِنْهُ حَبًّا مُتَرَاكِبًا وَمِنَ النَّخْلِ مِنَ النَّخْلِ مِنْ طَلْعِهَا قِنْوَانٌ دَانِيَةٌ وَجَنَّاتٍ مِنْ أَعْنَابٍ وَالزَّيْتُونَ وَالرُّمَّانَ مُشْتَبِهًا وَغَيْرَ مُتَشَابِهٍ انظُرُوا إِلَى ثَمَرِهِ إِذَا أَثْمَرَ وَيَنْعِهِ إِنَّ فِي ذَلِكَمْ لَآيَاتٍ لِقَوْمٍ يُؤْمِنُونَ

Artinya :

Dan Dialah yang menurunkan air hujan dari langit, lalu Kami tumbuhkan dengan air itu segala macam tumbuh-tumbuhan maka Kami keluarkan dari tumbuh-tumbuhan itu tanaman yang menghijau. Kami keluarkan dari tanaman yang menghijau itu butir yang banyak; dan dari mayang korma mengurai tangkai-tangkai yang menjulai, dan kebun-kebun anggur, dan (Kami keluarkan pula) zaitun dan delima yang serupa dan yang tidak serupa. Perhatikanlah buahnya di waktu pohonnya berbuah dan (perhatikan pulalah) kematangannya. Sesungguhnya pada yang demikian itu ada tanda-tanda (kekuasaan Allah) bagi orang-orang yang beriman. (QS. Al – An'am (6): 99)

Ayat diatas menjelaskan bahwa Allah SWT menurunkan air dari langit untuk menumbuhkan tanaman yang beranekaragam, menumbuhkan tumbuhan serta pepohonan yang hijau, dan mengeluarkan biji-bijian dari tumbuhan yang bersusun

pada tangkainya. Dan Allah SWT menganugerahkan kepada setiap manusia kebahagiaan agar mereka senantiasa bersyukur atas nikmat yang Allah SWT berikan. Allah SWT juga berfirman dalam QS. Asy-Syu'ara (6): 7 sebagai berikut:

وَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ

Artinya :

Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, betapa banyak Kami tumbuhkan di bumi itu berbagai macam pasangan (tumbuh-tumbuhan) yang baik? (QS. Asy-Syu'ara (6): 7).

Pada sepenggal ayat dari surah Asy-Syu'ara (زَوْجٍ كَرِيمٍ) memiliki arti ‘‘tumbuhan – tumbuhan yang baik’’, kalimat tersebut memiliki makna bahwa diantara tumbuh-tumbuhan yang baik itu adalah tumbuhan yang memiliki banyak manfaat. Dalam kitab tafsir as-showi pada kalimat (مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ) menjelaskan bahwa Allah SWT menciptakan tumbuhan yang ada dimuka bumi ini, dan tumbuhan yang diciptakan-Nya memiliki berbagai macam manfaat sehingga dapat mendatangkan suatu kebaikan (Al-Qurthubi, 2009).

Banyak sekali jenis tanaman obat yang bermanfaat di Indonesia, salah satunya ialah tanaman insulin (*Thitonia diversifolia* (Hemsl) Gray). *T. diversifolia* (Hemsl) Gray) atau tanaman insulin tergolong ke dalam family Asteraceae yang merupakan jenis tanaman tropika dan dapat digunakan sebagai obat tradisional. Insulin banyak tumbuh besar di seluruh daerah Indonesia, terutama di kota Yogyakarta. Berbagai senyawa kimia yang terkandung di dalam tanaman ini terletak pada bagian akar dan daunnya seperti senyawa fenol, derivate ester, metil ester, dan glikosida (Rolim *et al.*, 2011).

Bagian daun tanaman insulin dapat dijadikan sebagai antimikroba, antioksidan, serta mengurangi risiko kanker usus, dan beberapa manfaat lainnya.

Umumnya daun insulin dimanfaatkan sebagai obat penyakit diabetes mellitus (Polreich S, 2003). Penderita diabetes mellitus sangat cocok mengkonsumsi daun insulin karena daun insulin berfungsi sebagai pemanis yang dapat meningkatkan sekresi insulin serta meningkatkan sensitivitas reseptor insulin, selain itu daun insulin dapat memproduksi gula dihepatosit, serta memodulasi sindrom metabolik (Prizka *et al.*, 2016). Sudoyo (2015) mengemukakan bahwa berdasarkan data IDF, Diabetes mellitus merupakan penyebab kematian di dunia dengan presentase 415 juta orang yang mengidap penyakit ini. Pada tahun 2020 presentase meningkat menjadi 425, peningkatan ini akan terjadi di setiap tahunnya seiring dengan meningkatnya kemakmuran suatu Negara, terutama pada Negara berkembang karena perubahan pada gaya hidup yang menyebabkan obesitas yang menimbulkan resiko terserangnya penyakit diabetes mellitus. Beberapa penelitian yang telah dilakukan membuktikan bahwa daun pada tanaman insulin dapat digunakan sebagai antidiabetes. Pada penelitian H. A Kadir (2016) menunjukkan hasil bahwa air rebusan daun insulin dapat menurunkan kadar glukosa darah pada penderita diabetes mellitus.

Berdasarkan penelitian yang telah dipaparkan maka daun insulin *T. diversifolia* (Hemsl) Gray) terbukti mampu untuk dijadikan sebagai obat. Oleh karena itu perlu adanya langkah perbanyakan dalam skala besar guna memperbanyak tanaman ini. Beberapa upaya dapat dilakukan seperti melakukan eksplorasi secara langsung, propagasi konvensional dan lain-lain. Namun tidak semua upaya akan berdampak positif bagi lingkungan, melakukan eksplorasi secara langsung dapat menyebabkan kerusakan alam sekitar, sedangkan jika melakukan propagasi konvensional dirasa kurang efektif hal ini diakibatkan upaya ini memiliki

beberapa kekurangan yakni musim berbuah yang terbatas waktunya, sifat-sifat keturunan yang variatif, membutuhkan tempat yang luas, dan keterbatasan jumlah benih yang dihasilkan (Nursyamsi, 2010). Melihat upaya ekplorasi dan propagasi konvensional kurang efektif, maka upaya lain yang dirasa efektif untuk dilakukan ialah dengan melalui kultur jaringan. Teknik kultur jaringan menjadi alternatif dalam upaya memperbanyak tanaman, hal ini dikarenakan teknik kultur jaringan memiliki berbagai keuntungan antara lain mampu menghasilkan bibit dalam jumlah banyak dan seragam dalam waktu yang singkat (Lestari *et al.*, 2013). Selain itu teknik ini dapat pula untuk memproduksi metabolit sekunder yang dilakukan sepanjang tahun secara besar-besaran tanpa dipengaruhi oleh cuaca dan mudah untuk dimurnikan karena sel-sel yang dihasilkan tidak banyak mengandung pigmen (Putro Aji, 2017).

Salah satu teknik yang dapat menghasilkan dan memperbanyak sel kalus secara massal yaitu dengan induksi kalus. Induksi kalus sering digunakan dalam teknik ini karena kalus merupakan tahap awal dari teknik kultur *in vitro*. Selain itu induksi kalus dapat menjadi cara alternatif untuk memperoleh metabolit sekunder dalam waktu yang relatif singkat (Khaniyah *et al.*, 2017). Kalus juga merupakan sumber bahan tanam yang penting dalam proses regenerasi tanaman karena setiap tanaman memiliki kemampuan untuk membentuk suatu individu baru. Oleh karena itu upaya induksi kalus merupakan tahap yang penting serta efisien untuk mendapatkan bibit tanaman insulin yang cepat dan dalam jumlah banyak karena kalus dapat diinisiasi dari bagian tanaman manapun (Yulianti Rasud dan Bustaman, 2020). Kalus merupakan suatu kumpulan sel amorphous yang terjadi di dalam sel-sel yang akan membelah diri secara terus menerus. Pembentukan kalus dalam kultur

in vitro dapat berhasil dengan baik apabila syarat-syarat yang diperlukan dalam pembentukan kalus terpenuhi, salah satunya ialah ketersediaan zat pengatur tumbuh, baik zat pengatur tumbuh endogen maupun eksogen (Dieni Fauzziyah *et al.*, 2018).

Zurkarnain (2009) mengemukakan bahwa sulit dalam upaya perbanyakan tanaman tanpa melibatkan zat pengatur tumbuh didalamnya. Sekumpulan senyawa organik atau hormon tumbuh yang memiliki daya untuk merangsang tanaman merupakan definisi dari zat pengatur tumbuh, zat pengatur tumbuh terdiri dari zat pengatur tumbuh endogen merupakan zat pengatur tumbuh yang tercipta secara langsung didalam tanaman, sedangkan zat pengatur tumbuh eksogen yang diberi oleh manusia dengan proses sintesis. Proses pembentukan organ seperti tunas ataupun akar dapat dilakukan dengan memberikan kombinasi zat pengatur tumbuh eksogen dan endogen ke dalam media (Winata, 1987). Pada induksi kalus umumnya zat pengatur tumbuh yang ditambahkan ialah dengan mengkombinasikan antara auksin dan sitokinin yang harus diberikan secara seimbang, agar dapat menginduksi kalus dengan optimal. Selain itu faktor pemicu proses pertumbuhan dan perkembangan jaringan adalah dengan penambahan auksin dan sitokinin pada media kultur sehingga konsentrasi zat pengatur tumbuh endogen dalam sel meningkat (Poonsapaya *et al.*, 1989). Suprpto (2004) mengemukakan bahwa pengembangan sel, proses pembentukan kalus, serta proses respirasi dapat dipengaruhi oleh adanya zat pengatur tumbuh auksin. Selain itu, auksin juga dapat digunakan untuk proses induksi kalus, melakukan kultur suspensi dan akar, dan juga mempengaruhi pemanjangan serta pembelahan sel pada suatu kambium (Pierik, 1997). Sedangkan sitokinin merupakan senyawa turunan adenin yang

memiliki peran dalam proses pembelahan sel serta morfogenesis, dalam kultur jaringan sitokinin berfungsi untuk merangsang terbentuknya tunas, sitokinin juga dapat berpengaruh dalam proses metabolisme sel (Karjadi dan Buchory, 2008). (Sitinjak *et al.*, 2015) menambahkan bahwa selain pemberian auksin, sitokinin yang diberikan juga memiliki peran dalam proses pembelahan serta pemanjangan sel hingga dapat mempercepat perkembangan suatu tanaman.

Pada umumnya jenis auksin yang paling banyak digunakan untuk menginduksi kalus ialah NAA (*Naphthalene Acetic Acid*) hal ini dikarenakan NAA mempunyai sifat kimia lebih stabil dibandingkan dengan IAA (Zaer *et al.*, 1985). NAA (*Naphthalene Acetic Acid*) merupakan termasuk golongan auksin sintetik yang secara luas dalam kultur jaringan digunakan untuk pembentukan akar dan dikombinasikan dengan sitokinin untuk proliferasi tunas. Sedangkan untuk jenis sitokinin yang paling banyak digunakan untuk menginduksi kalus ialah BAP (*Benzyl Amino Purine*) hal ini dikarenakan BAP lebih tahan terhadap degradasi dan harganya lebih murah (Purwani, 2012). Beberapa penelitian telah membuktikan bahwa penggunaan NAA dan BAP dalam induksi kalus menghasilkan hasil yang optimal, pada penelitian Andaryani, S (2010) mengenai pengaruh variasi konsentrasi NAA dan BAP terhadap induksi kalus jarak pagar (*Jathropa culcas* L.) menunjukkan hasil bahwa kombinasi perlakuan 0 ppm menghasilkan kalus yang lebih cepat dibandingkan dengan perlakuan 1 ppm. Penelitian selanjutnya oleh Hikmah (2008), yang menyatakan bahwa kombinasi perlakuan 1 ppm BAP dan 1 ppm NAA menghasilkan saat muncul kalus tercepat dan semua kalus yang dihasilkan bertekstur remah. Pemilihan zat pengatur tumbuh (ZPT) dan konsentrasi yang tepat merupakan salah satu faktor yang dapat menentukan pembentukan kalus

pada tanaman yang akan dikultur (Indah dan Ermavitalini, 2013). Penelitian yang dilakukan Riska A (2019) juga menghasilkan hasil yang optimal yakni kombinasi perlakuan 0,5 ppm NAA + 2 ppm BAP berpengaruh nyata pada kemunculan kalus.

Berdasarkan uraian latar belakang diatas, telah diketahui bahwa jenis auksin yang paling banyak digunakan untuk menginduksi kalus suatu tanaman ialah NAA (*Naphthalene Acetic Acid*) sedangkan untuk jenis sitokinin menggunakan BAP (*Benzyl Amino Purine*) dan hasil kombinasi kedua zat pengatur tumbuh tersebut menghasilkan hasil yang optimal seperti halnya pada penelitian Andaryani, S (2010) NAA dan BAP digunakan untuk menginduksi kalus tanaman jarak pagar, pada penelitian Amalina *et al* (2020) NAA dan BAP digunakan untuk menginduksi kalus tanaman gaharu, untuk itu perlu dilakukan penelitian menggunakan kombinasi variasi konsentrasi zat pengatur tumbuh NAA dan BAP pada tanaman daun insulin mengingat belum adanya penelitian yang menggunakan tanaman insulin (*Tithonia diversifolia* (Hemsl)).

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah

1. Bagaimana pengaruh kombinasi variasi konsentrasi zat pengatur tumbuh (ZPT) NAA (*Naphthalene Acetic Acid*) dan BAP (*Benzyl Amino Purine*) terhadap induksi kalus tanaman insulin (*Tithonia diversifolia* (Hemsl))?
2. Manakah kombinasi variasi konsentrasi zat pengatur tumbuh (ZPT) NAA (*Naphthalene Acetic Acid*) dan BAP (*Benzyl Amino Purine*) yang optimal dalam induksi kalus tanaman insulin (*Tithonia diversifolia* (Hemsl))?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dalam penelitian ini adalah

1. Untuk mengetahui pengaruh kombinasi variasi konsentrasi zat pengatur tumbuh (ZPT) NAA (*Naphthalence Acetic Acid*) dan BAP (*Benzyl Amino Purine*) terhadap induksi kalus tanaman insulin (*Tithonia diversifolia* (Hemsl)).
2. Untuk mengetahui kombinasi variasi konsentrasi zat pengatur tumbuh (ZPT) NAA (*Naphthalence Acetic Acid*) dan BAP (*Benzyl Amino Purine*) yang optimal dalam induksi kalus tanaman insulin (*Tithonia diversifolia* (Hemsl)).

1.4 Manfaat Penelitian

Hasil dari penelitian ini diharapkan memiliki nilai guna atau manfaat sebagai berikut :

1. Untuk dijadikan dasar penelitian selanjutnya mengenai pertumbuhan kalus tanaman insulin (*Thitonia diversifolia* (hemsl)).
2. Untuk memberikan informasi mengenai perlakuan paling optimal antara kombinasi variasi konsentrasi zat pengatur tumbuh NAA dan BAP terhadap induksi kalus tanaman insulin (*Thitonia diversifolia* (hemsl)).

1.5 Batasan Penelitian

Batasan masalah dalam penelitian ini adalah

1. Bagian tanaman yang digunakan sebagai eksplan adalah daun insulin urutan kedua hingga keempat dari bagian pucuk.
2. Media yang digunakan adalah media MS (*Murashige and Skoog*). Penambahan zat pengatur tumbuh berupa kombinasi variasi konsentrasi zat pengatur tumbuh NAA (*Naphthalence Acetic Acid*) dan BAP (*Benzyl Amino Purine*) .
3. Parameter yang diamati meliputi waktu pembentukan kalus, berat basah dan berat kering kalus, warna kalus, tekstur kalus dan anatomi kalus.

1.6 Hipotesis Penelitian

Hipotesis dalam penelitian adalah

Terdapat pengaruh kombinasi variasi konsentrasi zat pengatur tumbuh NAA dan BAP terhadap induksi kalus tanaman insulin (*Tithonia diversifolia* (Hemsl)).



UIN SUNAN AMPEL
S U R A B A Y A

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Deskripsi Tanaman Insulin (*Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray)

Tanaman insulin ((*Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray) umumnya dikenal dengan sebutan rondo semoyo, harsaga, kirinyu, atau kayu paik (Didik dan Sulistijowati, 2001). Hutapea (1994) mengemukakan bahwa tanaman insulin memiliki ciri morfologi diantara lain tergolong kedalam jenis tumbuhan perdu tegak, yang memiliki tinggi kurang lebih (\pm) 5 cm. Batang tanaman ini berwarna hijau dan dilengkapi daun tunggal serta bunga yang tergolong kedalam bunga majemuk. Habitat tanaman insulin umumnya berada di tempat curam, seperti tebing, tepi sungai, dan juga selokan. Tanaman Insulin dapat dengan mudah tumbuh ditempat yang memiliki ketinggian 5-1500 meter diatas permukaan laut (Mdpl), tergolong kedalam tumbuhan tahunan yang menyukai tempat-tempat terang yang terkena sinar matahari secara langsung (S.A., 2001).



Gambar 2.1 Tanaman insulin (*Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray)
(Amanatie *et al.*, 2015)

Tanaman ini sudah dikenal di Indonesia dalam 2-3 tahun terakhir, khususnya masyarakat Wonosobo sudah mengenal hingga membudidayakan tanaman insulin, hal ini dikarenakan keefektifitasannya sebagai tanaman antidiabetes. Menurut Prizka *et al* (2016) daun insulin diyakini dapat menurunkan serta mengontrol kadar gula darah dengan cara mengkonsumsi daun insulin sebanyak 2 hingga 3 kali sehari.

2.2 Klasifikasi Tanaman Insulin (*Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray)

Klasifikasi Tanaman Insulin (*Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray) (J.R. Hutapea, 1994) adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Plantae
Division	: Spermatophyta
Subdivision	: Angiospermae
Class	: Dicotyledoneae
Order	: Asterales
Family	: Asteraceae
Genus	: <i>Tithonia</i>
Species	: <i>Tithonia diversifolia</i> (Hemsl.) A. Gray

2.3 Kandungan dan Manfaat Tanaman Insulin (*Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray)

Tanaman insulin (*Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray) mengandung senyawa aktif antara lain *phenol*, *chlorogenic*, *caffeonylquinic*, *ferulic*, *fruktooligosakarida* dan *flavonoid*. Tidak hanya senyawa tersebut, protein, lipid, serat dan sakarida, catechone, dan juga terpenes juga terkandung di dalam daun insulin. Johnson *et al* (2009) mengemukakan bahwa daun insulin memiliki manfaat

seperti insulin yaitu dapat digunakan untuk menurunkan kadar glukosa pada hepatosit. Beberapa senyawa aktif yang ada dalam tanaman insulin memiliki manfaat tersendiri seperti *fructooligosacarida*, *flavonoid*, *smallanthaditerpenic acid*, *octadecatrienoic acid*, dan *smallanthaditerpenic acid A, B, C, D* dapat menurunkan kadar glukosa darah, *Fructooligosacarida* untuk memodulasi sindrom metabolic dan dislipidemia dengan menurunkan absorbs kolesterol dalam usus halus. Untuk *phenol*, *chlorogenic*, *caffeonylquinic*, *ferulic* dalam daun insulin dijadikan sebagai antioksidan pada pasien yang menderita diabetes mellitus untuk proses perbaikan pada sel sel β yang ada di dalam pankreas. Antioksidan sendiri merupakan komponen aktif yang digunakan dalam proses regulasi metabolisme glukosa (Widowati, 2009).

2.4 Deskripsi Teknik Kultur Jaringan

Teknik kultur jaringan merupakan teknik dalam menumbuh-kembangkan tanaman baik dari sel, jaringan, maupun organ dalam dengan kondisi yang aseptik. Teknik kultur jaringan dicirikan dengan kondisi yang aseptik, penggunaan media kultur dengan kandungan nutrisi dan zat pengatur tumbuh yang optimal, serta kondisi ruang kultur dengan pencahayaannya yang terkontrol. Terdapat beberapa tipe dalam kultur jaringan berdasarkan pada bagian tanaman yang akan dikulturkan, yaitu kultur kalus, kultur suspensi sel, kultur akar adventif, kultur pucuk tunas, dan kultur embrio (Yusnita, 2003). Welsh (1991) mengemukakan bahwa kemampuan tanaman dalam menghasilkan anakan (tanaman baru), serta proses pertumbuhan sel yang belum berdeferensiasi merupakan definisi dari kultur jaringan. Pembentukan kalus dapat dihasilkan dari bagian tanaman yang masih muda atau dalam kondisi

“*totipotensi*” dimana bagian tersebut dapat berdeferensiasi membentuk tanaman lengkap kembali seperti pada bagian daun, batang, dan juga akar.

Teknik kultur jaringan merupakan teknik yang lebih baik untuk diaplikasikan dibandingkan dengan metode perbanyakan tanaman secara vegetatif konvensional hal ini dikarenakan, teknik kultur jaringan memiliki beberapa keuntungan diantara lain yaitu 1) dapat memperbanyak tanaman *true-to-type* dalam jumlah besar dengan waktu yang relatif singkat 2) pelaksanaan dalam teknik kultur jaringan untuk memproduksi bibit tidak tergantung dengan musim 3) tidak memerlukan tempat yang luas 4) dapat menghasilkan bibit lebih sehat karena berasal dari kultur *in vitro* yang steril 5) untuk mengeliminasi patogen yang sistemik dari tanaman induk, yaitu dengan *cara shoot-tip grafting* atau kultur meristem *in vitro* 6) untuk mengoleksi dan memelihara plasma nutfah. Selain memiliki beberapa keuntungan, teknik ini juga memiliki beberapa kelemahan diantara lain yaitu 1) memerlukan laboratorium dengan peralatan dan bahan kimia yang mahal 2) memerlukan keahlian khusus (Dr. Ir. Dwi H *et al.*, 2018). Dalam teknik kultur jaringan terdapat beberapa faktor yang mempengaruhinya antara lain, proses sterilisasi, pemilihan bahan eksplan yang akan digunakan, adapun juga faktor lingkungan terdiri dari pH, cahaya, temperatur, serta kandungan zat pengatur tumbuh (ZPT) dalam media kultur (Dinda *et al.*, 2015). Santoso dan Nursandi (2002) menambahkan bahwa zat pengatur tumbuh yang ada didalam tanaman merupakan senyawa organik, bukan unsur hara serta memiliki manfaat dalam mendukung, menghambat, serta dapat mengubah proses fisiologi tumbuhan.

Adapun tahap-tahap dalam melakukan perbanyakan tumbuhan dengan menggunakan metode kultur jaringan menurut (Harianto, 2009) adalah sebagai berikut:

1. Pembuatan Media

Media merupakan faktor penentu dalam perbanyakan tanaman melalui kultur jaringan. Komposisi media terdiri dari garam, mineral, vitamin, dan hormon. Selain itu, terdapat beberapa bahan tambahan yang diperlukan seperti agar, gula, dan bahan lainnya. Dalam pembuatan media terdapat beberapa hal yang diperlukan yakni ketersediaan zat pengatur tumbuh (ZPT), zat pengatur tumbuh yang akan digunakan juga bervariasi, baik dari jenis maupun jumlahnya, hal ini disesuaikan dengan tujuan kultur jaringan yang akan dilakukan. Penggunaan komposisi media yang paling baik dapat mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan tanaman dalam pengkulturan. Yusnita (2003) mengemukakan bahwa dalam bentuknya media dapat dibedakan menjadi dua bentuk yakni bentuk cair dan padat.

Media MS (*Murashige dan Skoog*) merupakan media yang paling banyak digunakan untuk berbagai tujuan dari kultur jaringan. Media MS (*Murashige dan Skoog*) mengandung komposisi 40 mM N dalam bentuk NO_3 dan 29 mM N dalam bentuk NH_4^+ . Kandungan N ini, 5 kali lebih tinggi dibandingkan dari N total yang terdapat pada media *Miller*, dan 19 kali lebih tinggi dari Media *White*. Kalium juga dapat ditingkatkan sampai 20 mM, sedangkan P 1,25 mM, unsur-unsur makro yang terkandung lainnya konsentrasinya dinaikkan sedikit saja (Hariani, 2018).

Secara luas media MS (*Murashige dan Skoog*) telah dikembangkan sejak tahun 1962, pembuatan media MS dilakukan dengan berbagai modifikasi, seperti penambahan konsentrasi garam makro sebanyak setengah komponen atau dapat

pula menggunakan komposisi yang diinginkan (Gunawan, 1994). Wetter dan Constabel (1991) menambahkan bahwa media MS memiliki komposisi yang lebih baik dibandingkan dengan media yang lain diantara lain komposisi nitrat, kalium, dan ammonium pada media ini sangat tinggi.

2. Inisiasi

Inisiasi merupakan proses pengambilan eksplan dari bagian tanaman yang akan dilakukan pengkulturan.

3. Sterilisasi

Sterilisasi merupakan segala kegiatan yang dilakukan dalam kultur jaringan harus dilakukan di tempat yang steril, yaitu *laminar air flow* (LAF) dengan menggunakan peralatan yang steril. Sterilisasi juga dilakukan terhadap peralatan yang akan digunakan pada saat melakukan kultur jaringan, sterilisasi peralatan kultur jaringan dapat dilakukan dengan cara menggunakan alkohol yang disemprotkan secara merata pada peralatan yang akan digunakan.

4. Multiplikasi

Multiplikasi merupakan metode perbanyakan calon tanaman dengan menanam eksplan pada media. Metode ini dilakukan di dalam *laminar air flow* (LAF) hal ini dilakukan untuk menghindari kontaminasi yang akan menyebabkan gagalnya pertumbuhan eksplan. Botol kultur yang telah ditanami eksplan diletakkan pada rak-rak dan ditempatkan pada tempat yang steril dengan suhu ruang.

5. Pengakaran

Pengakaran merupakan fase dimana eksplan akan menunjukkan adanya pertumbuhan akar yang menandai bahwa proses kultur jaringan yang dilakukan berjalan dengan baik.

6. Aklimatisasi

Aklimatisasi merupakan metode memindahkan eksplan keluar dari ruangan aseptik ke bedeng. Pemindahan eksplan dilakukan secara hati-hati dan bertahap, dengan memberikan sungkup. Sungkup digunakan untuk melindungi bibit dari udara luar dan serangan hama penyakit, hal ini dikarenakan bibit hasil kultur jaringan sangat rentan terhadap serangan hama penyakit dan udara luar. Setelah bibit mampu beradaptasi dengan lingkungan barunya maka secara bertahap sungkup dilepaskan dan pemeliharaan dapat dilakukan dengan cara yang sama dengan pemeliharaan bibit generatif.

2.5 Tipe Kultur Jaringan

Berdasarkan penggunaannya kultur jaringan terbagi menjadi beberapa tipe terdiri atas (Suliansyah, 2013):

a. Kultur Embrio

Kultur embrio merupakan suatu teknik isolasi dan pertumbuhan aseptik embrio zigotik *nature* dan *innature* yang memiliki tujuan untuk mendapatkan tanaman yang viabel. Teknik ini telah banyak digunakan untuk sejumlah tanaman dengan berbagai macam tujuan antara lain: (1) penyelamatan embrio setelah dilakukan persilangan secara intergenetik (2) mempercepat siklus pemuliaan melalui pengkulturan *in vitro* bagi embrio yang sulit melakukan perkembangan (3) mempercepat proses pematangan dormansi biji-bijian yang sulit berkecambah dan (4) mendapatkan tanaman yang viabel setelah melakukan persilangan sendiri.

b. Kultur Meristem

Kultur meristem merupakan suatu teknik isolasi dan pertumbuhan aseptik yang dilakukan pada ujung tunas (*shoot-tips*) yang bertujuan untuk mendapatkan klon-klon tanaman yang bebas virus. Teknik ini paling banyak digunakan karena teknik ini dapat memproduksi klon-klon dengan cepat.

c. Kultur Kalus

Kultur kalus merupakan suatu teknik induksi dan pertumbuhan aseptik yang dilakukan secara *in vitro* yang bertujuan untuk mendapatkan tanaman yang baru atau untuk mendapatkan produk sekunder tanaman. Teknik kultur kalus memiliki beberapa tujuan antara lain (1) dapat menghasilkan varian genetik yang berguna (2) dapat digunakan untuk memproduksi produk kimia yang berguna.

d. Kultur Anther

Kultur anther merupakan suatu teknik isolasi yang steril dan perkembangan kultur kalus haploid dari polen secara *in vitro*. Teknik kultur anther bertujuan untuk memproduksi haploid dengan cepat homozigot dan seleksi bentuk-bentuk mutan.

e. Kultur Protoplas

Kultur protoplas merupakan suatu teknik isolasi yang steril yang memiliki tujuan untuk memodifikasi genetik sel.

2.6 Kultur Kalus

Kultur kalus merupakan proses proliferasi massa jaringan yang belum terdeferensiasi, sel ini akan terbentuk di seluruh permukaan irisan eksplan sehingga semakin luas permukaan irisan eksplan semakin cepat dan banyak kalus yang terbentuk (Hendaryono dan Wijayanti, 1994). Gunawan (1992) menambahkan

bahwa penyebab bagian eksplan terluka dan pada akhirnya membentuk kalus disebabkan oleh otolisis sel. Bagian sel yang terluka juga dapat menghasilkan senyawa yang berfungsi pada proses pembelahan sel pada lapisan selanjutnya. Beberapa hal yang perlu diperhatikan dalam kultur kalus yakni tekstur dan warna kalus. Penanda dalam menentukan kualitas dari kalus yang terbentuk dapat dilihat dari teksturnya. Penggolongan tekstur dalam pembentukan kalus terbagi menjadi beberapa tekstur yaitu kompak (*non friable*), intermediet, dan remah (*friable*). Tekstur kalus yang kompak (*non friable*) merupakan tekstur kalus yang dapat digunakan sebagai penanda bahwa kalus yang terbentuk dapat menghasilkan metabolit sekunder. Menurut Indah dan Ermavitalini (2013) teksur kalus kompak dianggap baik karena tekstur kalus kompak dapat mengakumulasi metabolit sekunder lebih banyak. Ariati (2012) menambahkan bahwa kalus yang memiliki tekstur yang kompak pada umumnya memiliki ukuran sel kecil dengan sitoplasma padat, inti besar, dan memiliki banyak pati gandum.

Kalus remah merupakan kalus yang baik untuk perbanyakan jaringan. Kalus remah adalah kalus yang tumbuh terpisah-pisah menjadi bagian-bagian yang kecil, mudah lepas, dan juga mengandung banyak air. Menurut Rahayu *et al* (2003) kalus yang remah dapat diperoleh dengan cara melakukan subkultur yang dilakukan secara berulang-ulang dengan menggunakan medium padat. Pemberian zat pengatur tumbuh dalam medium dapat mempengaruhi proses pembentukan serta pertumbuhan kalus. Kalus yang terbentuk dan mengalami pertumbuhan dengan baik dicirikan dengan warna putih yang menandakan bahwa kalus tersebut mengalami pembelahan. Dwi *et al* (2012) mengemukakan bahwa kalus yang memiliki warna hijau di dalamnya mengandung banyak klorofil. Warna hijau pada

kalus terjadi akibat proses peningkatan sitokinin yang tinggi. Penambahan sitokinin dalam media mampu mengaktifkan proses metabolisme dalam sintesis protein dan juga proses perombakan butir klorofil (Wardani, 2004).

Pada teknik kultur jaringan, menginduksi kalus merupakan salah satu langkah yang penting. Proses terbentuknya kalus dimulai dari pelukaan pada bagian eksplan tanaman yang masih muda, dimana bagian ini akan terdeferensiasi. Dalam upaya perbanyak tanaman, terutama perbanyak tanaman secara vegetatif teknik yang dapat digunakan yaitu kultur kalus maupun kultur sel. Menurut Yuwono (2006) apabila suatu eksplan ditanam dalam waktu 2-4 minggu pada medium padat maupun cair yang sesuai dengan medium dan jenis spesiesnya, maka sel-sel parenkim yang ber dinding tipis pada kalus akan terbentuk dan hal itu merupakan suatu hasil akhir dari proses poliferasi pada jaringan induk akibat adanya pelukaan pada jaringan organ. Nasir (2002) menambahkan bahwa bagian akar, batang, dan daun dapat digunakan sebagai eksplan untuk membentuk suatu kalus. Kalus terbentuk dari jaringan tanaman yang sudah disayat dan dipisahkan dari tanaman, kemudian kemudian disterilkan untuk mengurangi kontaminasi pada biakan.

Hormon yang paling banyak digunakan dalam proses penginduksian kalus adalah hormon auksin. Induksi kalus merupakan proses dalam menghasilkan tanaman utuh. Selain hormon auksin, sitokinin biasanya menjadi perpaduan kombinasi yang diberikan dalam induksi kalus bersama dengan auksin, guna menghasilkan kalus yang optimal sehingga dapat merangsang pertumbuhan (Santoso dan Nursandi, 2004). George dan Klerk (2008) mengemukakan bahwa unsur hara terbagi menjadi dua jenis yakni jenis makro dan mikro, nitrogen, kalium, kalsium, fosfor, magnesium, dan juga sulfur tergolong kedalam unsur hara jenis

makro yang digunakan oleh tanaman dalam skala besar (1-15mg/berat kering tanaman). Untuk Fe, Cu, Ma, Zn, B,Mo,Co dan CI digunakan pada unsur hara jenis mikro yang lebih sedikit dibutuhkan oleh tanaman (0,1 mg/berat kering tanaman).

2.7 Zat Pengatur Tumbuh (ZPT)

Zat pengatur tumbuh adalah suatu senyawa organik dalam konsentrasi rendah dapat merangsang serta merubah pertumbuhan dan perkembangan tumbuhan secara kualitatif maupun kuantitatif, zat pengatur tumbuh (ZPT) tergolong menjadi beberapa kelompok hormon antara lain sitokinin, giberelin, auksin dan etilen. Zat pengatur tumbuh yang pada umumnya digunakan untuk membantu mempercepat pertumbuhan akar yaitu auksin. Menurut Wiratmaja (2017), hormon auksin merupakan suatu zat aktif didalam suatu sistem perakaran, yang dapat membantu dalam proses pembiakan secara vegetatif, yang mana satu sel auksin dapat mempengaruhi pembelahan sel, pemanjangan sel, dan pembentukan akar.

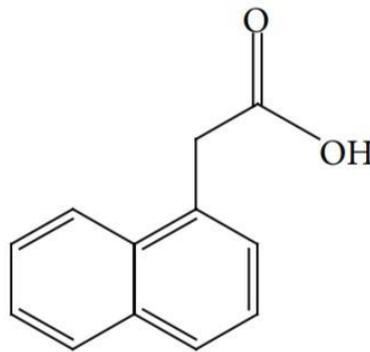
Di dalam kultur jaringan, kehadiran zat pengatur tumbuh (ZPT) sangat berpengaruh nyata. Pierik (1997) menyatakan bahwa sulit untuk menerapkan teknik kultur jaringan pada upaya perbanyakan tanaman tanpa melibatkan zat pengatur tumbuh (ZPT). Fungsi ZPT (zat pengatur tumbuh) dalam hal ini adalah untuk membantu pembelahan dan perkembangan sel serta untuk meningkatkan metabolisme dalam tubuh eksplan. Sitokinin adalah salah satu jenis hormon tumbuhan yang berperan dalam pembelahan sel serta mengatur pertumbuhan dan perkembangan. Menurut Zulkarnain (2014), mekanisme kerja hormon sitokinin hampir sama dengan kinetin namun dalam kultur jaringan pada umumnya peneliti menggunakan hormon sitokinin dan auksin.

2.8 NAA (*Naphthalene Acetic Acid*)

NAA (*Naphthalene Acetic Acid*) merupakan termasuk golongan auksin sintetik. Auksin merupakan hormon tumbuhan yang dapat ditemukan pada ujung batang, akar dan pembentukan bunga yang memiliki fungsi untuk mengatur perbesaran sel dan dapat memicu pemanjangan sel pada daerah belakang ujung meristem (Enny dan Seprita, 2018). Auksin banyak digunakan secara luas pada kultur *in vitro* guna merangsang pertumbuhan kalus, suspense sel dan juga organ (Gunawan, 1998). Salisbury dan Ross (1995) menambahkan bahwa auksin dapat menyebabkan sel pada potongan eksplan mengeluarkan H^+ ke dalam dinding sel primer yang menyelimutinya, selain itu juga dapat menurunkan pH yang nantinya akan membantu pengenduran dalam dinding sel sehingga proses pertumbuhan akan terjadi dengan cepat. Dalam proses induksi embriogenesis somatik dibutuhkan konsentrasi auksin yang tinggi dibandingkan dengan pemberian sitokinin. Namun ada pula pada beberapa jenis tanaman tertentu membutuhkan hormon sitokinin yang tinggi dibandingkan dengan auksin seperti pada tanaman monokotil. Pemberian auksin pada proses induksi sel embriogenik dilakukan dengan menginisiasi aktifitas differensiasi gen serta memanipulasi sekumpulan gen untuk meningkatkan populasi sel embriogenik melalui proses pembelahan sel yang terjadi secara berulang.

Dewi (2008) menyebutkan bahwa penambahan panjang batang, proses pertumbuhan, differensiasi, dan juga akar yang mengalami percabangan disebabkan oleh pemberian auksin. Auksin dapat terbagi menjadi beberapa jenis antara lain: *Indole Acetic Acid* (IAA), *Indole Butyric Acid* (IBA), *Napthalene acetic Acid* (NAA), dan (2,4-D) *Dichlorophenoxy Acetic Acid*. Keberhasilan jaringan untuk

membentuk akar dipengaruhi oleh penambahan auksin ke dalam media. Penambahan auksin ke dalam media dimaksudkan untuk mikropropagasi, pertumbuhan kalus, serta proses suspensi sel atau organ pada jaringan meristem, tunas atau ujung akar, dan dapat digunakan pula dalam proses morfogenesis (George dan Sherrington, 1984). Struktur NAA disajikan pada (gambar 2.2).



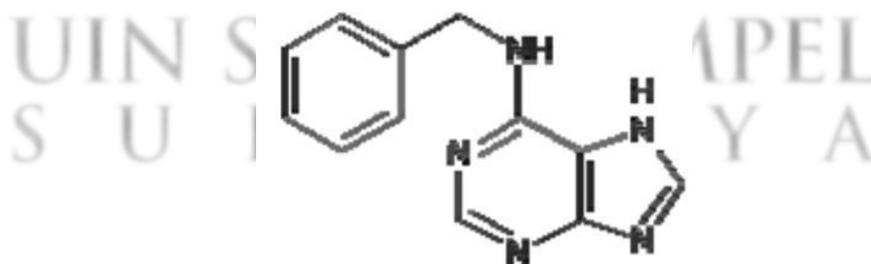
Gambar 2.2 Struktur *Naphthalene Acetic Acid* (Shifeng et al., 2014)

2.9 BAP (*6-Benzylaminopurine*)

BAP merupakan sitokinin yang sering digunakan, hal ini karena nilai keefektifitasannya yang dimiliki cukup tinggi dalam proses perbanyak tanaman, selain itu penggunaan BAP memiliki harga yang relatif murah dibandingkan dengan kinetin (Yusnita, 2003). BAP merupakan golongan dari hormon sitokinin sintetik yang aktif dan memiliki daya rangsang lebih lama, hal ini dikarenakan BAP tidak mudah dirombak oleh enzim yang ada didalam tanaman. BAP memiliki struktur kinetin yang aktif dalam proses pertumbuhan serta poliferasi kalus, sehingga dapat dikatakan BAP merupakan hormon sitokinin yang paling aktif (Suheb, 2018). Hormon tumbuhan atau yang lebih dikenal dengan sebutan fitohormon dapat mempengaruhi proses pertumbuhan dan perkembangan suatu tumbuhan. Santoso dan Nursandi, (2004) menambahkan bahwa hormon dalam tumbuhan dinilai sebagai regulasi genetik yang berfungsi sebagai prekursor atau

bahan tambahan yang dimasukkan ke dalam bagian tumbuhan, dimana apabila pemberian konsentrasi hormon telah tercukupi maka gen yang semula telah aktif menjadi tidak aktif dan begitu sebaliknya. Abidin (1985), mengemukakan bahwa hormon merupakan senyawa organik yang bukan dari golongan unsur hara yang berada di dalam suatu tanaman. Terdapat 5 kelompok zat pengatur tumbuh pada tanaman diantaranya auksin, giberelin, sitokinin, etilen, dan inhibitor yang memiliki ciri khas serta pengaruh yang berlawanan terhadap proses fisiologi.

Sitokinin merupakan kelompok hormon tumbuhan yang memiliki fungsi utama yakni dapat memacu pembelahan tunas samping (*lateral*), meningkatkan klorofil daun serta memperlambat proses penuaan (*senescence*) pada daun, buah, dan organ-organ lainnya (Wattimena, 1988). Jenis hormon sitokinin yang sering digunakan karena dinilai efektif untuk merangsang pertumbuhan tunas adalah BAP, BAP tahan terhadap oksidasi serta merupakan hormon sintetik yang paling murah dari sitokinin sintetik yang lainnya. Struktur BAP disajikan pada (gambar 2.3).



Gambar 2.3 Struktur 6-Benzylaminopurine (Silva, 2012)

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 9 perlakuan. Perlakuan yang digunakan yaitu kombinasi variasi konsentrasi zat pengatur tumbuh (ZPT) NAA (*Naphthalene Acetic Acid*) dan BAP (*Benzyl Amino Purine*). Masing-masing perlakuan dilakukan 3 kali ulangan berdasarkan rumus Federer (1963):

$$(n-1)(t-1) \geq 15$$

$$(n-1)(9-1) \geq 15$$

$$(n-1)(8) \geq 15$$

$$n-1 \geq 1,875$$

$$n \geq 2$$

Rancangan penelitian dapat dilihat pada tabel 3.1 berikut :

Tabel 3.1 Rancangan Penelitian

Perlakuan	Ulangan		
	1	2	3
A	A1	A2	A3
B	B1	B2	B3
C	C1	C2	C3
D	D1	D2	D3
E	E1	E2	E3
F	F1	F2	F3
G	G1	G2	G3
H	H1	H2	H3
I	I1	I2	I3

Keterangan :

A : NAA (0 ppm) + BAP (0ppm) (Tanpa Penambahan ZPT)

B : NAA (2 ppm) + BAP (1,5ppm)

C : NAA (2 ppm) + BAP (1 ppm)

D : NAA (4 ppm) + BAP (0,5ppm)

E : NAA (4 ppm) + BAP (1,5ppm)

F : NAA (4 ppm) + BAP (1 ppm)

G : NAA (6 ppm) + BAP (0,5 ppm)

H : NAA (6 ppm) + BAP (1,5 ppm)

I : NAA (6 ppm) + BAP (1 ppm)

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan Januari 2022 – Juli 2022 yang bertempat di Laboratorium Terintegrasi Universitas Islam Negeri Sunan Ampel Surabaya. Adapun rincian waktu penelitian dapat dilihat pada tabel 3.2.

Tabel 3.2 Jadwal Pelaksanaan Penelitian

No	Kegiatan	Bulan (2021)										Bulan (2022)							
		4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	
1	Pembuatan Proposal Skripsi	■																	
2	Seminar Proposal	■																	
3	Persiapan Alat dan Bahan	■																	
4	Aklimatisasi Tanaman	■																	
5	Sterilisasi	■																	
6	Pembuatan Media	■																	
7	Penanaman Eksplan	■																	
8	Pengamatan Waktu Pembentukan Kalus, Morfologi Kalus, dan Berat Basah Kering Kalus	■																	
9	Analisis Data	■																	
10	Pembuatan Draft Skripsi	■																	
11	Sidang Skripsi	■																	

3.3 Alat dan Bahan Penelitian

3.3.1 Alat

Alat yang digunakan antara lain gelas ukur, erlenmeyer, botol kultur, cawan petri, timbangan analitik, pH meter, pengaduk kaca, *hot plate*, *magnetic stirrer*, *beaker glass*, pipet tetes, alat diseksi (*scalpel*, blade, pinset sedang, dan pinset kecil), bunsen, kaca arloji, spatula, *micropipette* biru, *micropipette* kuning, tip kuning, tip biru, oven, gunting, korek api, *autoclave*, *laminar air flow* (LAF), *sprayer*, plastik, kertas saring, kertas label, kertas coklat, *tissue*, *plastikwrap*, aluminium foil, lemari pendingin, kamera Hp, alat tulis dan rak kultur.

3.3.2 Bahan

Bahan utama yang digunakan adalah bagian daun insulin (*Thitonia diversifolia* (Hemsl) sebagai eksplan yang akan ditanam pada media yang telah diidentifikasi berdasarkan jurnal sains dan matematika oleh Amanatie *et al* (2015).

Bahan untuk sterilisasi adalah aquades, alkohol 70%, deterjen sunlight, spirtus, bayclin, NaOH 1 N, HCL 1 N. Media dasar yang digunakan adalah media MS (*Murashige & Skoog*) M519 yang komposisinya dapat dilihat pada (lampiran 1). ZPT yang digunakan dari NAA (*Naphthalene Acetic Acid*) dan BAP (*Benzyl Amino Purine*) . Bahan-bahan lain untuk pembuatan media adalah gula dan agar-agar.

3.4 Variabel Penelitian

Variabel penelitian pada penelitian ini adalah:

1. Variabel bebas, berupa kombinasi variasi konsentrasi zat pengatur tumbuh NAA (*Naphthalene Acetic Acid*) dan BAP (*Benzyl Amino Purine*).
2. Variabel terikat, meliputi waktu pembentukan kalus, warna kalus, tekstur kalus, anatomi kalus, berat basah kalus, dan berat kering kalus.
3. Variabel kontrol, meliputi cahaya, suhu, eksplan daun insulin (*Thitonia diversifolia* (hemsl)).

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Sterilisasi Alat

Pada tahap ini, sterilisasi alat dilakukan dengan cara mencuci alat gelas, botol kultur, dan alat diseksi (*scalpel*, blade, pinset sedang, dan pinset kecil) dengan sabun cuci kemudian dibilas menggunakan air bersih lalu dikeringkan. Alat-alat diseksi dan cawan petri dibungkus menggunakan kertas coklat dan dimasukkan kedalam plastik yang tahan panas, sedangkan untuk peralatan alat gelas pada bagian mulutnya ditutup menggunakan aluminium foil. Setelah semua terbungkus, alat-alat tersebut dimasukkan ke dalam *autoclave* dan disterilisasi pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 20 menit.

3.5.2 Pembuatan Larutan Stok Zat Pengatur Tumbuh NAA

Pada tahap ini larutan stok NAA (*Naphthalene Acetic Acid*) sebanyak 500 ppm (500mg/L) mula-mula dibuat dengan cara menimbang 50 mg NAA, dan diletakkan ke dalam *beaker glass* kemudian ditambahkan sebanyak 100 ml aquades. Selanjutnya larutan dihomogenkan sampai larut, apabila larutan sulit terlarut ditambahkan beberapa tetes 1 N NaOH, kemudian larutan dihomogenkan kembali hingga benar-benar terlarut. Apabila larutan telah terlarut, larutan dimasukkan dalam botol dan diberi label: NAA, 500 ppm (500 mg/L) untuk disimpan di dalam lemari pendingin.

3.5.3 Pembuatan Larutan Stok Zat Pengatur Tumbuh BAP

Pembuatan larutan zat pengatur tumbuh (*Benzyl Amino Purine*) sebanyak 500 ppm (500mg/L) dilakukan dengan menimbang 50 mg BAP, kemudian ditambahkan sebanyak 100 ml aquades. Selanjutnya larutan dihomogenkan sampai larut, apabila larutan sulit terlarut ditambahkan beberapa tetes 1 N HCL, kemudian larutan dihomogenkan kembali hingga benar-benar terlarut. Apabila larutan telah terlarut, larutan dimasukkan dalam botol dan diberi label: BAP, 500 ppm (500mg/L) untuk disimpan di dalam lemari pendingin.

3.5.4 Pembuatan Media

Pembuatan media, langkah pertama dengan menimbang 0,26 gram media MS (*Murashige & Skoog*) sehingga setiap perlakuan membutuhkan 60ml dan masing-masing botol berisikan 20ml, kemudian dimasukkan kedalam erlenmeyer. Ditambahkan gula sebanyak 1,8 gram ke dalam erlenmeyer yang berisi media MS. Kemudian dilarutkan dengan aquades sampai volume larutan mencapai 60 ml. Selanjutnya ditambahkan zat pengatur tumbuh NAA dan BAP sesuai dengan yang

telah ditentukan. Dilakukan pengukuran pH larutan sekitar 5,6 – 5,8, jika nilai pH < 5,6 maka ditambahkan NaOH dan jika pH > 5,8 ditambahkan HCl. Kemudian ditambahkan agar sebanyak 0,48 gram. Setelah itu, larutan media dipanaskan diatas *Hot plate* hingga mendidih dan dituang kedalam masing-masing botol kultur yang sudah diberi label sebanyak 20 ml, serta ditutup mulut botol menggunakan aluminium foil. Media yang telah dibuat disterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit.

Untuk membuat larutan stok NAA/BAP dengan konsentrasi tertentu, menggunakan rumus sebagai berikut:

$$V1 \cdot M1 = V2 \cdot M2$$

Keterangan:

V1 : Volume NAA/BAP larutan stok

M1 : Konsentrasi stok NAA/BAP

V2 : Volume total medium yang akan dibuat

M2 : Konsentrasi NAA/BAP yang dikendaki

3.5.5 Sterilisasi Ruang Tanam

Tahap sterilisasi ruang tanam dilakukan dengan mensterilkan dinding dan lantai pada ruang tanam dengan menggunakan desinfektan. LAF (*laminar air flow*) juga perlu disterilkan memakai *tissue* yang sudah dibasahi sebelumnya dengan alkohol 70%, kemudian diratakan pada setiap sudut meja dan kaca LAF. Sterilisasi pada LAF (*laminar air flow*) dilakukan karena LAF menjadi tempat untuk melakukan penanaman eksplan. Setelah itu, dilanjutkan dengan memasukkan semua alat yang sudah disterilkan dengan menggunakan *autoclave* ke dalam LAF dengan menyemprotkan terlebih dahulu alkohol 70% pada setiap sisi bagian alat.

Kemudian dilanjutkan dengan menyalakan lampu ultraviolet (UV) dan dibiarkan selama 30 menit. Setelah 30 menit, lampu UV dimatikan, digantikan dengan menyalakan lampu neon dan *blower*.

3.5.6 Sterilisasi Eksplan

Sterilisasi eksplan dilakukan dengan cara mengambil bagian daun insulin *Thitonia diversifolia* (hemsl) yang masih muda (urutan kedua sampai keempat pada bagian pucuk). Permukaan daun insulin *Thitonia diversifolia* (hemsl) tersebut dicuci dengan cara daun direndam dalam detergen sunlight selama 5 menit, kemudian dibilas dengan air mengalir hingga bersih sambil digosok dengan tangan secara perlahan. Selanjutnya dilakukan perendaman dalam LAF (*laminar air flow*) menggunakan larutan *bayclin* 10% selama 15 menit . Kemudian eksplan dibilas sebanyak 3 kali menggunakan aquades steril selama 5 menit. Setelah itu, eksplan siap untuk ditanam.

3.5.7 Penanaman Eksplan

Penanaman eksplan dilakukan dengan mengambil eksplan daun insulin *Thitonia diversifolia* (hemsl) yang telah steril, diletakkan diatas cawan petri yang telah dialasi kertas saring. Daun insulin *Thitonia diversifolia* (hemsl) dipotong dengan ukuran $\pm 1 \times 1 \text{ cm}^2$. Sebelum dilakukan penanaman, mulut botol dipanaskan terlebih dahulu dengan lampu bunsen. Kemudian eksplan diletakkan dalam botol kultur sesuai dengan perlakuan menggunakan pinset steril yang sebelumnya telah dipanaskan diatas lampu bunsen. Setiap botol kultur diisi dengan 2 eksplan, mulut botol ditutup menggunakan aluminium foil serta dilapisi dengan *plastik wrap*. Selanjutnya botol-botol kultur yang berisikan eksplan diletakkan dalam ruang kultur untuk diinkubasi selama 1 bulan dengan suhu 20-25°C

3.5.8 Tahap Pemeliharaan

Pada tahap pemeliharaan dilakukan dengan melakukan penyemprotan menggunakan alkohol 70% setiap 3 hari sekali pada bagian sisi botol kultur yang berisikan eksplan.

3.5.9 Paramater Pengamatan

3.5.9.1 Waktu Pembentukan Kalus

Pengamatan waktu pembentukan kalus dilakukan setiap hari terhitung dari hari saat pertama kali kalus terbentuk yang dinyatakan dalam hari setelah tanam (HST). Terbentuknya kalus pada suatu media dapat dijadikan indikator adanya pertumbuhan dalam kultur *in vitro*.

3.5.9.2 Warna dan Tekstur Kalus

Pengamatan pada warna dan tekstur kalus dilakukan pada setiap minggu. Pengamatan ditinjau dari terbentuknya tekstur dan warna kalus, warna pada kalus meliputi warna hijau, hijau keputihan, kuning, kekuningan, putih kekuningan, putih kecoklatan, kuning kecoklatan, coklat dan lain-lain pada permukaan eksplan. Sedangkan tekstur pada kalus meliputi tekstur kompak (*non friable*), intermediet (*friable*), dan juga remah.

3.5.9.3 Pengamatan Anatomi Kalus

Pengamatan anatomi kalus dilakukan pada akhir pengamatan (minggu ke-4) dengan cara membuat preparat kalus menggunakan teknik irisan melintang tanpa pewarnaan pada *object glass* dan di tutup *cover glass*, setelah itu dilakukan pengamatan dibawah mikroskop dengan perbesaran 100x.

3.5.9.4 Berat Basah Kalus

Menentukan berat basah kalus dengan cara menimbang massa kalus basah yang terbentuk pada bagian eksplan setelah akhir pengamatan (selama 4 minggu) menggunakan timbangan analitik dengan satuan gram (g).

3.5.9.5 Berat Kering Kalus

Berat kering kalus dihitung dengan menimbang massa kalus kering (sudah dioven) selama 48 jam dengan suhu 40°C menggunakan timbangan analitik satuan gram (g) setelah akhir pengamatan (selama 4 minggu).

3.6 Analisis Data

Data pengamatan berupa data kuantitatif dan kualitatif. Data kualitatif meliputi morfologi kalus yaitu warna kalus, tekstur kalus, dan anatomi kalus akan dianalisis secara deskriptif, sedangkan data kuantitatif berupa waktu pembentukan kalus, berat basah, dan berat kering akan dianalisis menggunakan uji Statistik. Sebelum itu dilakukan uji normalitas dan uji homogenitas untuk melihat apakah data terdistribusi normal dan homogen, jika data terdistribusi normal maka dilanjutkan menggunakan uji statistik ANOVA dengan taraf kesalahan 5%, uji ini bertujuan untuk mengetahui adanya perbedaan pengaruh masing-masing perlakuan terhadap parameter yang diamati.

Setelah uji ANOVA, apabila hasil menunjukkan perbedaan nyata, maka dilakukan uji lanjutan (*post-hoc test*) LSD (*Least significant different*) untuk mengetahui perbedaan pada masing-masing perlakuan. Jika data terbukti tidak memenuhi syarat untuk dilakukan uji ANOVA maka dilanjutkan dengan uji *Kruskal-Wallis*. Lalu dilanjutkan dengan uji kelanjutan berupa uji *Mann-Whitney* untuk mengetahui perbedaan lebih lanjut antar perlakuan.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pengaruh Kombinasi Variasi Konsentrasi Zat Pengatur Tumbuh NAA (*Naphthalene Acetic Acid*) dan BAP (*Benzyl Amino Purine*) Terhadap Induksi Kalus Tanaman Insulin (*Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray)

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh kombinasi variasi konsentrasi zat pengatur tumbuh (NAA dan BAP) terhadap waktu pembentukan kalus, morfologi kalus, anatomi kalus, serta berat basah dan kering kalus. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, diketahui bahwa pemberian kombinasi variasi zat pengatur tumbuh (NAA dan BAP) dapat menginduksi kalus tanaman insulin (*Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray). Waktu Pembentukan kalus, morfologi kalus, serta berat basah dan kering kalus yang dihasilkan dapat dilihat pada tabel 4.1

Tabel 4.1 Hasil Penelitian Pengaruh Kombinasi Variasi Konsentrasi Zat Pengatur Tumbuh NAA (*Naphthalene Acetic Acid*) dan BAP (*Benzyl Amino Purine*) Terhadap Induksi Kalus Tanaman Insulin (*Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray)

Perlakuan	Rata-Rata Waktu Pembentukan Kalus (HST)	Warna Kalus	Tekstur Kalus	Presentase Pembentukan Kalus (%)	Rata-Rata Berat Basah \pm Standar Deviasi (gram)	Rata-Rata Berat Kering \pm Standar Deviasi (gram)
A	0	-	-	0	-	-
B	16,3 \pm 0,47	Putih Kehijauan, Putih Kecoklatan	Remah	100	0,8912 \pm 0,3713	0,0831 \pm 0,0310
C	17,6 \pm 0,47	Putih Kehijauan, Coklat	Remah	100	0,5631 \pm 0,2364	0,0467 \pm 0,0232
D	15,3 \pm 0,94	Putih Kehijauan	Remah	100	1,5322 \pm 1,0309	0,0906 \pm 0,0367
E	15,6 \pm 0,47	Putih Kehijauan	Remah	100	0,7871 \pm 0,2332	0,0551 \pm 0,0033

Perlakuan	Rata-Rata Waktu Pembentukan Kalus (HST)	Warna Kalus	Tekstur Kalus	Presentase Pembentukan Kalus (%)	Rata-Rata Berat Basah \pm Standar Deviasi (gram)	Rata-Rata Berat Kering \pm Standar Deviasi (gram)
F	14,3 \pm 0,47	Putih Kehijauan, Putih Kecoklatan	Remah	100	0,7202 \pm 0,1184	0,0603 \pm 0,0185
G	16,6 \pm 0,47	Coklat	Remah	100	0,7496 \pm 0,5827	0,0649 \pm 0,0276
H	14,6 \pm 0,81	Hijau Kecoklatan	Remah	100	0,9217 \pm 0,5156	0,2524 \pm 0,2466
I	17 \pm 2,16	Putih Kehijauan	Kompak	100	0,2051 \pm 0,0927	0,0247 \pm 0,0100

Keterangan A= NAA (0 ppm) + BAP (0 ppm)(Kontrol), B= NAA (2 ppm) + BAP (1,5 ppm), C= NAA (2 ppm) + BAP (1 ppm), D= NAA (4 ppm) + BAP (0,5 ppm), E= NAA (4 ppm) + BAP (1,5 ppm), F= NAA (4 ppm) + BAP (1 ppm), G= NAA (6 ppm) + BAP (0,5 ppm), H= NAA (6 ppm) + BAP (1,5 ppm), I= NAA (6 ppm) + BAP (1 ppm).

Berdasarkan **tabel 4.1**, dapat diketahui bahwa penggunaan kombinasi variasi konsentrasi zat pengatur tumbuh NAA dan BAP dapat menginduksi terbentuknya kalus dibandingkan dengan perlakuan tanpa penambahan zat pengatur tumbuh (kontrol). Pemberian kombinasi variasi konsentrasi zat pengatur tumbuh NAA dan BAP menghasilkan beberapa warna kalus meliputi, putih kehijauan, putih kecoklatan, coklat, dan hijau kecoklatan serta menghasilkan kalus yang didominasi tekstur remah namun adapula kalus yang bertekstur kompak.

Data hasil pertumbuhan kalus meliputi waktu pembentukan kalus, berat basah dan berat kering kalus selanjutnya dianalisis secara statistik menggunakan uji non-parametrik berupa uji *Kruskal Wallis*, sebelum itu dilakukan uji normalitas dan uji homogenitas terlebih dahulu dan didapati hasil bahwa data tidak berdistribusi normal dan tidak homogen (Lampiran 12-13). Berdasarkan hasil data yang tidak

berdistribusi normal dan tidak homogen maka akan dilanjutkan dengan uji *Kruskal Wallis*, dan setelah itu akan dilakukan uji lanjutan *Post hoc* menggunakan uji *Mann-Whitney* dengan taraf *Asymp.Sig* < 0,05, yang menyatakan bahwa terdapat perbedaan signifikan pada data hasil waktu pembentukan kalus, berat basah dan kering kalus.

Hasil penelitian yang telah diperoleh, dapat diketahui bahwa perlakuan F yaitu NAA (4 ppm) + BAP (1 ppm) dapat membentuk kalus paling cepat yakni 14,3 HST dibandingkan dengan perlakuan menggunakan kombinasi variasi konsentrasi yang lain. Sedangkan untuk pengukuran rata-rata berat basah dan berat kering kalus mengalami perbedaan, pada berat basah kalus rata-rata tertinggi ada pada perlakuan D yaitu NAA (4 ppm) + BAP (0,5 ppm), untuk berat kering kalus rata-rata tertinggi ada pada perlakuan H yaitu NAA (6 ppm) + BAP (1,5 ppm). Hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diuraikan sebagai berikut:

4.1.1 Waktu Pembentukan Kalus

Data hasil waktu pembentukan kalus diperoleh dari perlakuan pengamatan yang dilakukan setiap hari setelah dilakukan penanaman eksplan yang dinyatakan dengan hari setelah tanam (HST). Terbentuknya kalus pada penelitian ini ditandai dengan melengkungnya eksplan dan pembengkakan eksplan. Hal ini sesuai dengan pernyataan Ajijah dkk (2010) yang mengatakan bahwa proses pembengkakan pada kalus merupakan suatu tahap awal pembentukan kalus dan merupakan sebuah indikasi adanya aktifitas sel pada eksplan. Proses pembengkakan pada jaringan eksplan akan ditandai dengan kemunculan kalus sebagai jaringan yang tidak terdeferensiasi (gambar 4.1). Kemunculan kalus pada eksplan merupakan sebuah indikator

dari adanya pertumbuhan dalam kultur *in vitro*. NAA yang berperan sebagai auksin serta BAP sebagai sitokinin merupakan faktor pemicu yang mendorong eksplan mengalami dediferensiasi, menjadikan sel lebih cepat menjadi meristematik semula hingga kalus terbentuk lebih awal (Queen KA *et al.*, 2016). Santoso dan Nursandi (2004) dalam Queen KA *et al* (2016) menambahkan bahwa pada dasarnya pembentukan kalus dibentuk oleh tanaman sebagai upaya dalam perlindungan terhadap pelukaan yang berfungsi sebagai jaringan penutup luka. Jika terdapat luka yang terbentuk maka terdapat proses induksi pembelahan sel sebagai penutup permukaan yang luka, pada hal ini hormon sitokinin memiliki peranan penting. Taiz dan Zeiger (2010) juga menambahkan bahwa auksin dan sitokinin sama-sama berperan dalam pembelahan sel dengan cara mengontrol aktivitas CDK (*Cyclin-Dependent Kinase*) dan enzim yang dapat menyebabkan pembelahan sel pada sel eukariot.



Gambar 4.1 Kalus Tanaman Insulin
(Sumber: Dokumentasi pribadi, 2022)

Pemberian hormon auksin dapat menaikkan tekanan osmotik, serta meningkatkan plastisitas dan pengembangan dinding sel. Plastisitas dan pengembangan dinding sel yang didorong oleh pemberian auksin, saat itu akan mengeluarkan H^+ ke dalam dinding sel dan H^+ akan menyebabkan pH pada dinding sel menurun dan akan terjadi pelonggaran struktur dinding sel dan terjadi pertumbuhan. Tidak hanya auksin, pemberian sitokinin juga berperan dalam pembentukan benang gelendong pada tahap metafase (Imam Mahadi *et al.*, 2016). Data hasil rata-rata waktu pembentukan kalus dapat dilihat pada tabel 4.2

Tabel 4.2 Hasil Waktu Pembentukan Kalus dalam HST

Perlakuan	Rata-Rata \pm Standar Deviasi (HST)	Nilai Uji Kruskal Wallis ($\alpha=5\%$)
A	0	0,012
B	16,333 \pm 0,47	
C	17,667 \pm 0,47	
D	15,333 \pm 0,94	
E	15,667 \pm 0,47	
F	14,333 \pm 0,47	
G	16,667 \pm 0,47	
H	14,667 \pm 0,81	
I	17,000 \pm 2,16	

Keterangan A= NAA (0 ppm) + BAP (0 ppm)(Kontrol), B= NAA (2 ppm) + BAP (1,5 ppm), C= NAA (2 ppm) + BAP (1 ppm), D= NAA (4 ppm) + BAP (0,5 ppm), E= NAA (4 ppm) + BAP (1,5 ppm),F= NAA (4 ppm) + BAP (1 ppm), G= NAA (6 ppm) + BAP (0,5 ppm), H= NAA (6 ppm) + BAP (1,5 ppm), I= NAA (6 ppm) + BAP (1 ppm).

Berdasarkan **tabel 4.2** diatas, dapat diketahui bahwa rata-rata waktu pembentukan kalus pada perlakuan A (kontrol) tanpa penambahan zat pengatur tumbuh tidak terlihat adanya pertumbuhan kalus, namun pada perlakuan yang lain yang diberi zat pengatur tumbuh terlihat adanya pertumbuhan kalus. Pada perlakuan (B) NAA 2 ppm + BAP 1,5 ppm yaitu 16,3 HST; (C) NAA 2 ppm + BAP 1 ppm

yaitu 17,6 HST; (D) NAA 2 ppm + BAP 1 ppm yaitu 15,3 HST; (E) NAA 4 ppm + BAP 1,5 ppm yaitu 15,6 HST; (F) NAA 4 ppm + BAP 1 ppm yaitu 14,3 HST; (G) NAA 6 ppm + BAP 0,5 ppm yaitu 16,6 HST; (H) NAA 6 ppm + BAP 1,5 ppm yaitu 14,6 HST; dan perlakuan (I) NAA 6 ppm + BAP 1 ppm yaitu 17 HST.

Data yang diperoleh kemudian dilakukan uji statistik dan diketahui bahwa data waktu pembentukan kalus tidak berdistribusi normal dan tidak homogen dilihat dari hasil uji normalitas yang memiliki nilai ($0,000 < 0,05$) dan uji homogen yang memiliki nilai ($0,002 < 0,05$), sehingga dilanjutkan dengan uji *Kruskal Wallis* karena p value kurang dari taraf signifikansi ($\alpha=0,05$). Di dapati hasil uji *Kruskal Wallis* memiliki nilai *Asymp.Sig.* 0,012 yang memiliki arti terdapat perbedaan waktu dari pembentukan kalus tanaman insulin karena p value $< 0,05$ (Lampiran 14). Berdasarkan hasil *Asymp.Sig.* $0,012 < 0,05$ maka dapat dilakukan uji lanjutan menggunakan uji *Mann-Whitney*. Hasil uji *Mann-Whitney* menunjukkan bahwa terdapat perbedaan waktu pembentukan kalus pada beberapa perlakuan, ditandai dengan nilai *Asymp.Sig.* $< 0,05$ yang dapat dilihat pada tabel 4.3

Tabel 4.3 Hasil Uji *Mann-Whitney* Waktu Pembentukan Kalus dalam HST

Perlakuan	A	B	C	D	E	F	G	H	I
A		0,011*	0,000*	0,097	0,061	0,044*	0,004*	0,188	0,014*
B			0,317	0,370	0,493	0,073	0,0732	0,216	0,916
C				0,58	0,092	0,005*	0,510	0,025*	0,268
D					0,833	0,370	0,216	0,732	0,429
E						0,268	0,304*	0,580	0,562
F							0,033*	0,580	0,092
G									0,654
H									0,114
I									

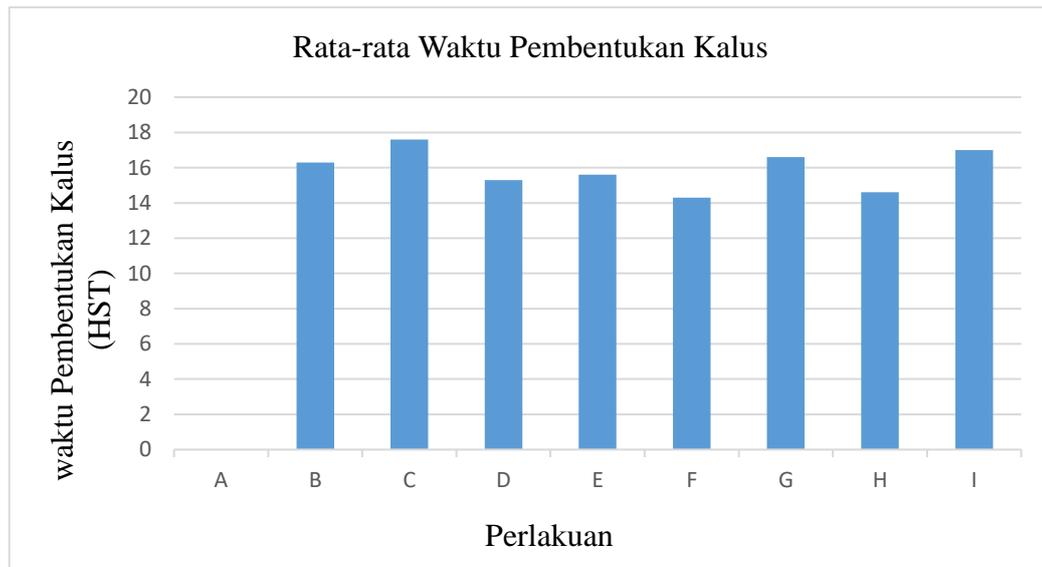
Keterangan A= NAA (0 ppm) + BAP (0 ppm)(Kontrol), B= NAA (2 ppm) + BAP (1,5 ppm), C= NAA (2 ppm) + BAP (1 ppm), D= NAA (4 ppm) + BAP (0,5 ppm), E= NAA (4 ppm) + BAP (1,5 ppm),F= NAA (4 ppm) + BAP (1 ppm), G= NAA (6 ppm) + BAP (0,5 ppm), H= NAA (6 ppm) + BAP (1,5 ppm), I= NAA (6 ppm) + BAP (1 ppm). *=perbedaan signifikan pada uji *Mann-Whitney* (p value $< 0,05$).

Berdasarkan **tabel 4.3**, diketahui bahwa perlakuan A berbeda signifikan dengan perlakuan (B,C,F,G, dan I), perlakuan C berbeda signifikan dengan

perlakuan (F dan H), perlakuan E berbeda signifikan dengan perlakuan G, serta perlakuan F berbeda signifikan dengan perlakuan G. Perbedaan secara signifikan ini dipengaruhi oleh kecepatan tumbuh kalus setelah penanaman eksplan.

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa penggunaan kombinasi konsentrasi serta beberapa jenis zat pengatur tumbuh yang diberikan dapat memberikan respon berbeda-beda pada waktu pembentukan kalus seperti pada penelitian Ni Kadek *et al* (2019) yang menggunakan konsentrasi NAA 0,5 mg/L dan BAP 0,5 mg/L pada tanaman *Lilium longiflorum* (yakni pada hari ke-11 setelah tanam (HST)) dan penelitian Junairiah *et al* yang menginduksi kalus pada tanaman *Piper betle* L. (2017) pada pengaplikasian zat pengatur tumbuh IAA 0,5 mg/L dan BAP 2,00 mg/L (yakni pada hari ke-8,5 setelah tanam (HST)). Perbedaan waktu dalam pembentukan kalus dipengaruhi oleh adanya komposisi zat pengatur tumbuh dalam media serta kondisi fisiologis suatu eksplan. Lizawati *et al* (2012) menambahkan bahwa, terbentuknya kalus dipengaruhi oleh jenis serta keseimbangan zat pengatur tumbuh auksin dan sitokinin yang diberikan dalam media, hal ini dikarenakan kecepatan pertumbuhan kalus dapat dipengaruhi oleh kerja zat pengatur tumbuh yang diberikan, selain itu fitohormon didalam eksplan juga mempengaruhi pembentukan kalus. Interaksi zat pengatur tumbuh yang ditambahkan dalam medium dan zat yang dihasilkan oleh tumbuhan secara endogen dapat menentukan kecepatan dan arah perkembangan suatu kultur (Gunawan, 1988). Peranan BAP dan NAA sebagai hormon eksogen dalam tanaman dapat mempengaruhi respon kinerja hormon endogen didalamnya sesuai dengan komposisi yang diberikan.

Perbedaan efektivitas zat pengatur tumbuh terhadap pertumbuhan tanaman dapat disebabkan dua aspek utama yakni unsur basa kimia dan gugus rantai sampingnya (Basri, 2008). Pemberian konsentrasi auksin dan sitokinin yang diberikan secara seimbang akan mempengaruhi terbentuknya suatu kalus dalam kultur *in vitro* melalui pembesaran serta pembelahan sel. Pada penelitian ini menggunakan zat pengatur tumbuh NAA sebagai golongan auksin dan BAP sebagai golongan sitokinin, umumnya sebagai hormon golongan sitokinin BAP sering digunakan dalam pengaplikasian penambahan zat pengatur tumbuh terhadap induksi kalus baik dikombinasi dengan NAA maupun dengan hormon lain. Hal ini dikarenakan BAP merupakan hormon sintetik yang aktif serta memiliki daya rangsang lebih lama sehingga tidak mudah dirombak oleh enzim yang ada didalam tanaman, selain itu BAP memiliki struktur kinetin yang aktif dalam pertumbuhan hingga poliferasi kalus (Suheb, 2018). Rinaldi (2016) mengemukakan bahwa keseimbangan kandungan antara auksin dalam eksplan yang cukup tinggi meskipun kandungan pada sitokinin yang rendah atau bahkan tidak ada, maka auksin saja dapat menginduksi pembentukan kalus pada eksplan. Menurut Khatun (2005) pemberian konsentrasi auksin yang tinggi dapat menghambat pertumbuhan serta pemanjangan pada akar, demikian pula pada pemberian sitokinin yang tidak dapat bekerja dengan baik dalam konsentrasi yang tinggi.



Gambar 4.2 Grafik Rata-Rata Waktu Pembentukan Kalus

Keterangan A= NAA (0 ppm) + BAP (0 ppm)(Kontrol), B= NAA (2 ppm) + BAP (1,5 ppm), C= NAA (2 ppm) + BAP (1 ppm), D= NAA (4 ppm) + BAP (0,5 ppm), E= NAA (4 ppm) + BAP (1,5 ppm), F= NAA (4 ppm) + BAP (1 ppm), G= NAA (6 ppm) + BAP (0,5 ppm), H= NAA (6 ppm) + BAP (1,5 ppm), I= NAA (6 ppm) + BAP (1 ppm).

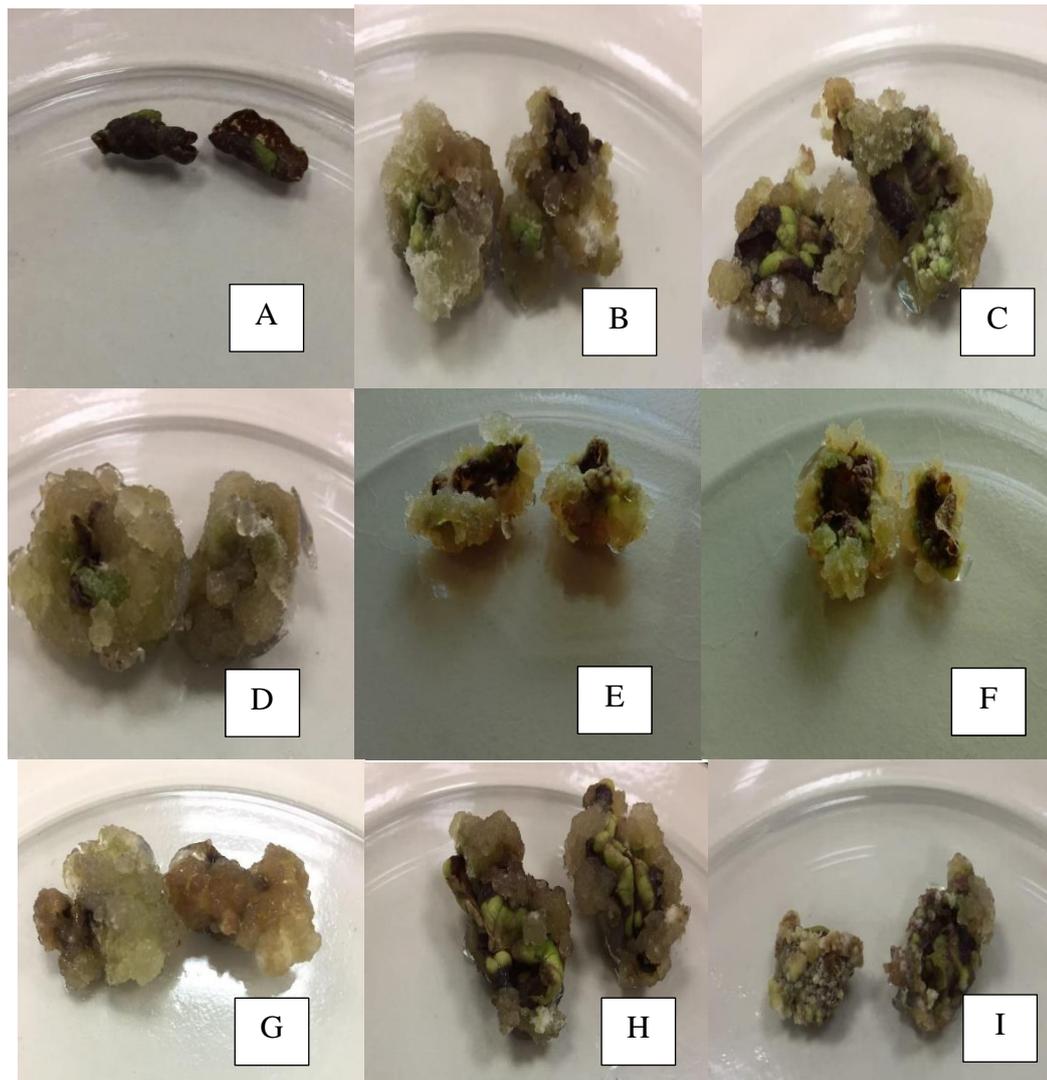
Dapat dilihat pada gambar 4.2 diatas, diketahui bahwa hasil optimal waktu pembentukan kalus pada penelitian ini ada pada konsentrasi NAA 4 ppm + BAP 1 ppm yakni 14,3 HST, hasil penelitian ini berbeda dengan penelitian Suci *et al* (2017) yang menggunakan konsentrasi NAA 4 ppm + 1,5 ppm pada tanaman Rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) menghasilkan waktu induksi kalus lebih cepat yakni pada hari ke-6 setelah tanam. Perbedaan terletak pada pengaplikasian zat pengatur tumbuh BAP pada penelitian ini nilai konsentrasi BAP rendah sedangkan pada penelitian Suci menggunakan konsentrasi BAP yang tinggi. Dalam penelitian Suci penggunaan hormon sitokinin (BAP) yang memiliki konsentrasi tinggi menghasilkan waktu pembentukan kalus lebih cepat. Perbedaan yang dihasilkan dapat disebabkan oleh penghambatan pada fitohormon, dimana fitohormon akan terhambat apabila konsentrasi baik auksin dan sitokinin terlalu tinggi dalam pengaplikasian proses induksi kalus (Shabeer *et al.*, 2021). Efektivitas zat pengatur tumbuh pada tanaman dipengaruhi oleh konsentrasi zat pengatur tumbuh yang

diberikan, karena dimana konsentrasi yang diberikan berbeda maka akan menimbulkan keefektivitasan yang berbeda pula Fahmi (2014) dalam Ganitha (2019). Selain dipengaruhi oleh konsentrasi zat pengatur tumbuh, kecepatan waktu pembentukan kalus juga dipengaruhi oleh hormon endogen dalam tanaman tersebut hal ini sesuai dengan pernyataan Samudin (2009) yang menyatakan bahwa interaksi serta keseimbangan zat pengatur tumbuh yang ditambahkan dalam media akan diproduksi oleh sel tanaman secara endogen hingga dapat mempengaruhi kecepatan dan arah perkembangan suatu kultur.

4.1.2 Morfologi Kalus

Pada pengamatan morfologi kalus terdapat dua aspek yang diamati meliputi tekstur dan warna kalus. Pada hasil perlakuan kombinasi variasi konsentrasi zat pengatur tumbuh NAA dan BAP menunjukkan adanya respon yang bervariasi terhadap pertumbuhan kalus tanaman insulin *Thitonia diversifolia* (hemsI). Respon pertumbuhan kalus dapat dilihat dari warna dan tekstur kalus yang diinkubasi selama 4 minggu (gambar 4.3; tabel 4.4)

UIN SUNAN AMPEL
S U R A B A Y A



Gambar 4.3 Kalus Tanaman Insulin *Thitonia diversifolia* (hems) yang telah berumur 4 minggu.

Keterangan A= NAA (0 ppm) + BAP (0 ppm)(Kontrol), B= NAA (2 ppm) + BAP (1,5 ppm), C= NAA (2 ppm) + BAP (1 ppm), D= NAA (4 ppm) + BAP (0,5 ppm), E= NAA (4 ppm) + BAP (1,5 ppm), F= NAA (4 ppm) + BAP (1 ppm), G= NAA (6 ppm) + BAP (0,5 ppm), H= NAA (6 ppm) + BAP (1,5 ppm), I= NAA (6 ppm) + BAP (1 ppm).

(Sumber: Dokumentasi pribadi, 2022)

Tabel 4.4 Hasil Warna dan Tekstur Kalus

Perlakuan	Ulangan	Warna Kalus	Tekstur Kalus
A	1	-	-
	2	-	-
	3	-	-
B	1	Putih Kehijauan	Remah
	2	Putih Kecoklatan	Remah
	3	Putih Kecoklatan	Remah
C	1	Putih Kehijauan	Remah
	2	Putih Kehijauan	Remah
	3	Coklat	Remah
D	1	Putih Kehijauan	Remah
	2	Putih Kehijauan	Remah
	3	Putih Kehijauan	Remah

Perlakuan	Ulangan	Warna Kalus	Tekstur Kalus
E	1	Putih Kehijauan	Remah
	2	Putih Kehijauan	Remah
	3	Putih Kehijauan	Remah
F	1	Putih Kehijauan	Remah
	2	Putih Kehijauan	Remah
	3	Putih Kecoklatan	Remah
G	1	Coklat	Remah
	2	Coklat	Remah
	3	Coklat	Remah
H	1	Hijau Kecoklatan	Remah
	2	Hijau Kecoklatan	Remah
	3	Hijau Kecoklatan	Remah
I	1	Putih Kehijauan	Kompak
	2	Putih Kehijauan	Kompak
	3	Putih Kehijauan	Kompak

Keterangan A= NAA (0 ppm) + BAP (0 ppm)(Kontrol), B= NAA (2 ppm) + BAP (1,5 ppm), C= NAA (2 ppm) + BAP (1 ppm), D= NAA (4 ppm) + BAP (0,5 ppm), E= NAA (4 ppm) + BAP (1,5 ppm), F= NAA (4 ppm) + BAP (1 ppm), G= NAA (6 ppm) + BAP (0,5 ppm), H= NAA (6 ppm) + BAP (1,5 ppm), I= NAA (6 ppm) + BAP (1 ppm).

Indikasi suatu pertumbuhan kalus juga dapat dilihat dari warna dan tekstur kalus. Warna kalus menggambarkan penampilan visual sel-sel pada kalus sehingga dapat diketahui bagaimana tingkat keaktifan pembelahan sel-selnya (Yulianti & Bustaman, 2020). Fatmawati *et al* (2010) menambahkan bahwa kalus yang terbentuk akan terus mengalami proliferasi dan nantinya akan membentuk jaringan dasar yang meristematik serta berdeferensiasi kedalam bentuk yang lebih spesifik. Pada **tabel 4.4** dapat diketahui bahwa kalus yang dihasilkan cenderung memiliki warna putih kehijauan meskipun begitu juga masih terdapat warna lain yang terbentuk seperti putih kecoklatan, coklat, dan hijau kecoklatan.

Perbedaan warna yang dihasilkan oleh kalus dikarenakan adanya perubahan pigmentasi, serta warna kalus juga dapat diindikasikan adanya klorofil di dalam jaringan. Ariati (2012) mengemukakan bahwa kalus yang berwarna hijau menandakan adanya kandungan klorofil pada kalus, sedangkan kalus yang berwarna putih hingga kekuningan menunjukkan bahwa kalus dapat berkembang dengan baik dan aktif mengalami pembelahan sel serta mengandung kloroplas yang tinggi. Beberapa warna yang dihasilkan dari kombinasi zat pengatur tumbuh NAA

dan BAP juga mengalami *browning* atau pencoklatan. *Browning* merupakan proses pembentukan pigmen warna kuning yang akan berubah menjadi coklat, hal ini dapat dipicu oleh reaksi oksidasi yang dikatalisis oleh enzim fenol oksidase atau polifenol oksidase (Samuel *et al.*, 2017). Hapsari dan Yusnita (2016) menambahkan bahwa pencoklatan yang terjadi terkadang tidak selalu merugikan hal ini dikarenakan kalus dapat muncul dari eksplan yang coklat bahkan warna hitam. Faktor penyebab terjadinya *browning* berasal dari penggunaan eksplan dari jaringan dewasa, tindakan dalam melakukan sterilisasi secara berlebihan, serta media atau lingkungan yang tidak mendukung (Sainawal *et al.*, 2017) dalam Ana *et al* (2022). Kalus yang tidak mengalami *browning* disebabkan akibat pemberian zat pengatur tumbuh NAA dan BAP yang diberikan sudah seimbang sehingga kalus dapat tumbuh dengan baik dan aktif melakukan metabolisme dalam sel.

Pemberian zat pengatur tumbuh NAA dan BAP pada penelitian ini cenderung menghasilkan warna putih kehijauan. Penelitian yang dilakukan oleh Ragapadmi Purnamaningsih (2011) dan Amalina (2020) menggunakan kombinasi konsentrasi zat pengatur tumbuh NAA dan BAP 0 mg/L, 0,5 mg/L, dan 1,0 mg/L mampu menghasilkan kalus yang terdiri dari berbagai macam warna seperti putih kekuningan, kuning, kekuningan, dan kuning kecoklatan. Berbanding terbalik dengan penelitian Ragapadmi dan Amalina, penelitian Tantri (2017) dan Nurhayati (2020) yang sama-sama menggunakan zat pengatur tumbuh NAA dan BAP namun pada konsentrasi 0 mg/L, 1 mg/L, dan 2 mg/L menghasilkan warna kalus cenderung warna hijau dan coklat saja. Penelitian ini selaras dengan penelitian Afriandi *et al* (2021), bahwa penambahan ZPT NAA dan BAP yang menggunakan konsentrasi sama seperti pada penelitian penelitian Tantri (2017) dan Nurhayati (2020)

menghasilkan warna putih kehijauan pada eksplan daun lada. Andaryani (2010) mengemukakan bahwa pemberian konsentrasi zat pengatur tumbuh yang tidak sesuai maka dapat berakibat fatal bagi pertumbuhan suatu jaringan. Dan apabila pemberian konsentrasi zat pengatur tumbuh yang terlalu tinggi dapat menyebabkan pertumbuhan menjadi terhambat.

Selain dilihat dari warna kalus, indikasi suatu pertumbuhan kalus juga dapat dilihat dari tekstur kalus. Pada penelitian ini, tekstur kalus yang dihasilkan pada kombinasi variasi konsentrasi zat pengatur tumbuh NAA dan BAP didominasi oleh tekstur remah dan ada satu perlakuan yang memiliki tekstur kalus kompak (tabel 4.4). Kalus remah umumnya digunakan untuk memperbanyak jaringan (Monikhatul Q, 2018). Kalus yang bertekstur remah memiliki ciri-ciri susunan sel yang rapat dan membentuk tonjolan padat (Santoso & Nursandi, 2003) dalam Tia Setiawati *et al* (2019). Mahadi *et al* (2016) dalam Tia Setiawati *et al* (2019) menambahkan bahwa kalus yang memiliki tekstur remah mengalami pembelahan sel yang cepat daripada tekstur kalus yang kompak. Kalus dengan tekstur yang remah dapat digunakan untuk kultur suspensi karena memiliki sel tunggal yang mudah dipisahkan (Fetmi *et al.*, 2021).

Umumnya kalus dinyatakan memiliki tekstur yang baik apabila terbentuk tekstur yang remah, hal ini dikarenakan tekstur remah dapat dengan mudah dipisahkan untuk dilakukan kultur suspensi, selain itu dapat pula meningkatkan aerasi oksigen antar sel (Yulianti Rasud dan Bustaman, 2020). Terbentuknya kalus remah dipengaruhi oleh penambahan sitokinin dalam media yang mengandung auksin (Queen KA *et al.*, 2016). Syahid *et al* (2010) menambahkan bahwa adanya sitokinin dapat memacu pembelahan sel dalam proses sitokinesis pada saat sintesis

RNA dan protein yang akan memacu aktivitas auksin dalam pembelahan sel membentuk kalus. Pada penelitian ini juga tidak hanya terbentuk kalus remah, tetapi ada pula yang membentuk kalus kompak. Kalus kompak adalah kalus yang tersusun dari sel-sel yang sangat rapat serta memiliki tekstur padat dan keras (Dian E, 2018).

Terbentuknya kalus kompak disebabkan oleh pemberian sitokinin pada media kultur, melalui sistem transport sitokinin kemudian membawa air dan zat hara dari bagian basal ke apeks melalui pembuluh pengangkut yang dapat mempengaruhi potensial osmotik dalam sel. Penambahan sukrosa dalam medium akan mengakibatkan tekanan turgor, dimana tekanan turgor ini disebabkan oleh adanya perbedaan konsentrasi larutan, sehingga air dan zat hara akan masuk ke dalam sel melalui proses osmosis. Hal tersebutlah yang dapat membuat dinding sel pada jaringan menjadi kaku dan merubah kalus menjadi kompak (Purwaningsih *et al.*, 2007) dalam Tia *et al* 2019. Pembentukan tekstur kalus yang didominasi dengan tekstur remah pada penelitian ini, disebabkan oleh jenis eksplan, umur kalus, komposisi media serta kondisi pertumbuhan yang sama.

Pada penelitian ini, pemberian kombinasi variasi konsentrasi NAA dan BAP menghasilkan kalus yang memiliki tekstur remah. Pembentukan kalus yang memiliki tekstur remah disebabkan oleh zat pengatur tumbuh NAA yang menstimulasi pemanjangan sel dengan cara penambahan plastisitas dinding sel menjadi longgar, sehingga air dapat masuk ke dalam dinding sel melalui proses osmosis sehingga sel akan mengalami pemanjangan. Kalus remah mengandung banyak air karena kalus yang bertekstur remah belum mengalami lignifikasi dinding sel, serta antara kumpulan sel yang satu dengan yang lain relatif mudah dipisahkan (Nisak *et al.*, 2012). Pierik, (1987) dalam Triana, (2015) menambahkan

bahwa banyak faktor yang dapat mempengaruhi terbentuknya kalus antara lain jenis tanaman yang akan digunakan sebagai eksplan, komposisi nutrisi media, zat pengatur tumbuh yang digunakan, serta kondisi lingkungan kultur.

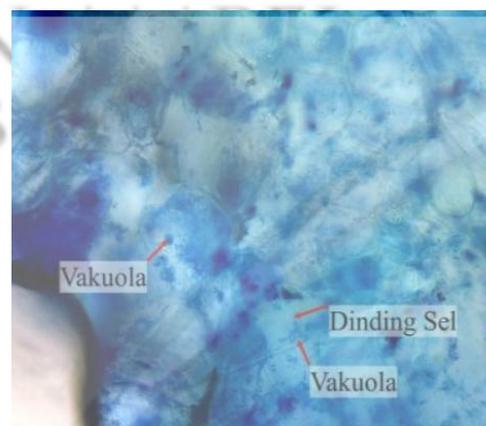
Penelitian ini sebanding dengan penelitian Ragapadmi *et al* (2011) yang menghasilkan kalus dengan tekstur remah pada proses induksi kalus tanaman *Artemisia annua* L. menggunakan penambahan zat pengatur tumbuh NAA dan BAP. Penelitian yang dilakukan oleh Tia *et al* (2019) juga mendukung bahwa pemberian kombinasi zat pengatur tumbuh NAA dan BAP mampu menghasilkan tekstur kalus remah pada tanaman krisan (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.).

4.1.3 Anatomi Kalus

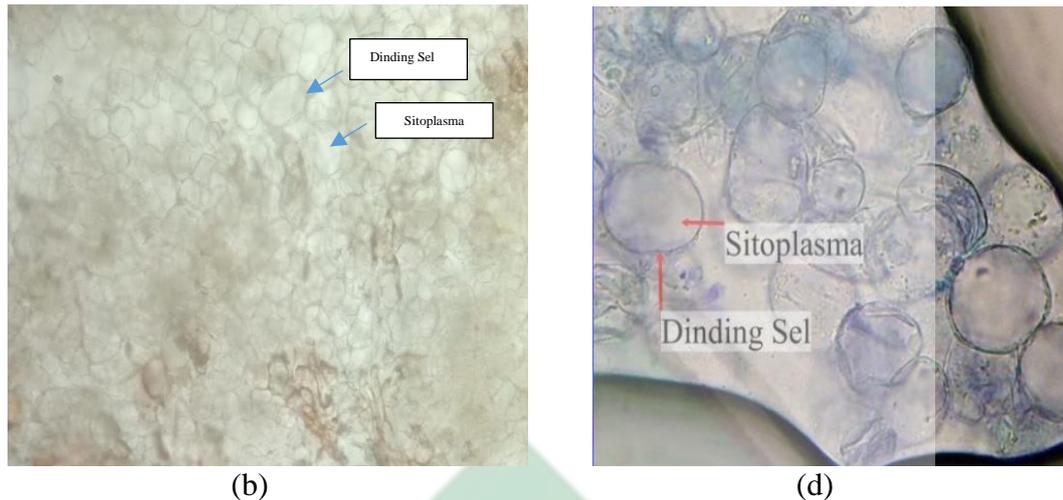
Struktur kalus yang didapat melalui pengamatan morfologi, kemudian diamati kembali secara anatomi guna melihat perbedaan struktur organel pada tekstur kalus remah dan kompak. Pengamatan dilakukan dengan perbesaran 100x dengan mikroskop binokuler. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa terdapat beberapa organel yang terlihat seperti yang ditunjukkan pada gambar 4.4 sebagai berikut



(a)



(c)



Gambar 4.4 Struktur Anatomi Kalus Daun Insulin Menggunakan Perbesaran 100x (a) Tekstur Kompak; (b) Tekstur Remah (Sumber: Dokumentasi Pribadi, 2022); Struktur Anatomi Kalus Daun Mangkokan Menggunakan Perbesaran 400x (c) Tekstur Kompak; (d) Tekstur Remah (Sumber: Riska A, 2019)

Hasil pengamatan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 100x yang terlihat pada **gambar 4.4** menunjukkan bahwa tekstur kalus kompak memiliki ukuran sel yang kecil, mengandung sitoplasma, dan inti selnya tidak terlihat. Hal ini sesuai dengan street (1993) dalam Riska (2019) yang mengemukakan bahwa kalus yang memiliki tekstur kompak memiliki susunan sel yang rapat sehingga sulit untuk dipisahkan. Sedangkan untuk tekstur kalus yang remah memiliki dinding sel yang terlihat jelas, juga terdapat sitoplasma, dan inti sel yang belum begitu jelas pada pengamatan.

Berdasarkan gambar diatas, hal ini selaras dengan penelitian yang dilakukan oleh Riska (2019) dalam penelitiannya Riska juga menghasilkan tekstur kalus kompak dengan ciri-ciri kalus berbentuk nodular, selnya rapat, memiliki ukuran sel yang kecil, terdapat sitoplasma yang padat, terdapat pati, akan tetapi pada tekstur kalus kompak inti sel nya tidak dapat terlihat dengan jelas. Sedangkan untuk kalus remah memiliki ciri-ciri kalus berbentuk tubular dikelilingi oleh sel yang renggang sehingga sangat mudah dipisahkan, ukuran sel kecil, terdapat inti sel dan sitoplasma.

4.1.4 Berat Basah Kalus

Berat basah kalus merupakan berat yang dihasilkan pada kecepatan sel-sel yang membelah diri, memperbanyak diri, serta dilanjutkan dalam pembesaran kalus (Dian E, 2018). Berat basah kalus tanaman insulin pada penelitian ini didapatkan dengan menimbang kalus yang telah tumbuh setelah di inkubasi selama 4 minggu. Data hasil rata-rata berat basah kalus dapat dilihat pada tabel 4.5

Tabel 4.5 Hasil Berat Basah Kalus

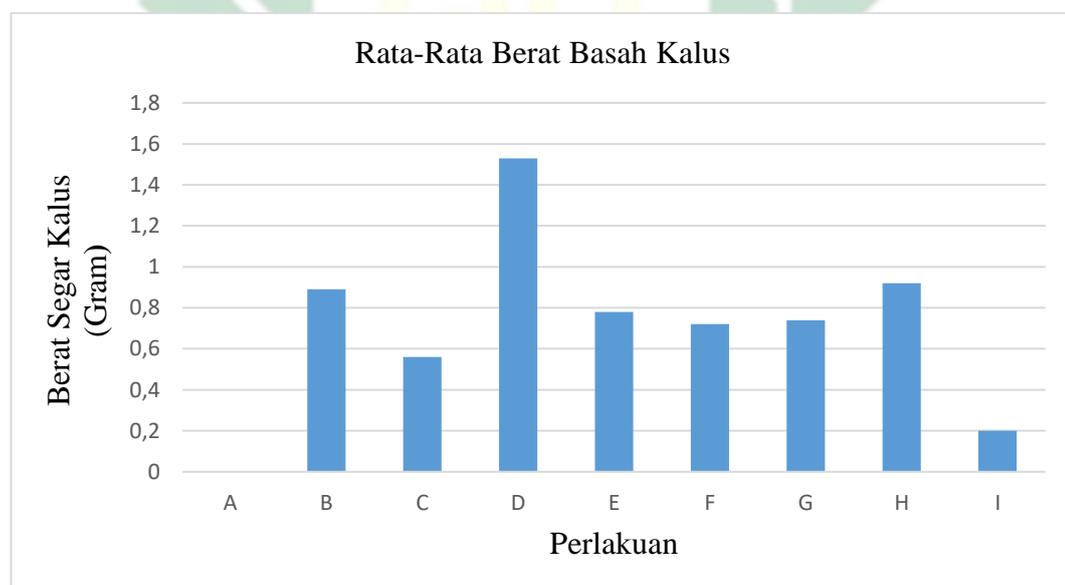
Perlakuan	Rata-Rata ± Standar Deviasi (gram)	Nilai Uji <i>Kruskal Wallis</i> ($\alpha=5\%$)
A	0	0,062
B	0,891 ± 0,371	
C	0,563 ± 0,236	
D	1,532 ± 1,030	
E	0,787 ± 0,233	
F	0,720 ± 0,118	
G	0,749 ± 0,528	
H	0,921 ± 0,515	
I	0,205 ± 0,092	

Keterangan A= NAA (0 ppm) + BAP (0 ppm)(Kontrol), B= NAA (2 ppm) + BAP (1,5 ppm), C= NAA (2 ppm) + BAP (1 ppm), D= NAA (4 ppm) + BAP (0,5 ppm), E= NAA (4 ppm) + BAP (1,5 ppm), F= NAA (4 ppm) + BAP (1 ppm), G= NAA (6 ppm) + BAP (0,5 ppm), H= NAA (6 ppm) + BAP (1,5 ppm), I= NAA (6 ppm) + BAP (1 ppm).

Berdasarkan **tabel 4.5**, dapat diketahui bahwa rata-rata berat basah kalus pada perlakuan (B) NAA (2 ppm) + BAP (1,5 ppm) yaitu sebesar 0,891 gram; perlakuan (C) NAA (2 ppm) + BAP (1 ppm) yaitu sebesar 0,563 gram; (D) NAA (4 ppm) + BAP (0,5 ppm) yaitu sebesar 1,532 gram; perlakuan (E) NAA (4 ppm) + BAP (1,5 ppm) yaitu sebesar 0,787 gram; perlakuan (F) NAA (4 ppm) + BAP (1 ppm) yaitu sebesar 0,720; perlakuan (G) NAA (6 ppm) + BAP (0,5 ppm) yaitu sebesar 0,749 gram; perlakuan (H) NAA (6 ppm) + BAP (1,5 ppm) yaitu sebesar

0,921 gram; dan perlakuan (I) NAA (6 ppm) + BAP (1 ppm) yaitu sebesar 0, 205 gram.

Data yang diperoleh kemudian dilakukan uji statistik dan diketahui bahwa data waktu pembentukan kalus tidak berdistribusi normal dan tidak homogen dilihat dari hasil uji normalitas yang memiliki nilai ($0,001 < 0,05$) dan uji homogen yang memiliki nilai ($0,002 < 0,05$) (lampiran 15-16), sehingga dilanjutkan dengan uji *Kruskal Wallis* karena p value kurang dari taraf signifikansi ($\alpha=0,05$). Di dapati hasil uji *Kruskal Wallis* memiliki nilai *Asymp.Sig.* 0,062 yang memiliki arti tidak terdapat perbedaan waktu dari pembentukan kalus tanaman insulin karena p value $> 0,05$ (Lampiran 17). Berdasarkan hasil *Asymp.Sig.* $0,062 > 0,05$ maka tidak dapat dilakukan uji lanjutan menggunakan uji *Mann-Whitney*.



Gambar 4.5 Grafik Rata-Rata Berat Basah Kalus

Keterangan A= NAA (0 ppm) + BAP (0 ppm)(Kontrol), B= NAA (2 ppm) + BAP (1,5 ppm), C= NAA (2 ppm) + BAP (1 ppm), D= NAA (4 ppm) + BAP (0,5 ppm), E= NAA (4 ppm) + BAP (1,5 ppm),F= NAA (4 ppm) + BAP (1 ppm), G= NAA (6 ppm) + BAP (0,5 ppm), H= NAA (6 ppm) + BAP (1,5 ppm), I= NAA (6 ppm) + BAP (1 ppm).

Berdasarkan hasil **gambar 4.5 diatas**, menunjukkan bahwa rata-rata berat basah kalus tertinggi ada pada perlakuan D yakni kombinasi antara NAA 4 ppm + BAP 0,5 ppm yaitu sebesar 1,5322 gram. Sedangkan untuk berat basah kalus

terendah ada pada perlakuan I yakni kombinasi antara NAA 6 ppm + BAP 1 ppm yaitu sebesar 0,205 gram. Berat basah kalus yang tinggi dapat disebabkan oleh kandungan air pada kalus yang tinggi. Asmoro dan Sari (2016) menambahkan bahwa berat basah kalus dapat meningkat karena dipengaruhi oleh pembesaran sel.

Zat pengatur tumbuh auksin dapat menyebabkan pengenduran pada dinding sel yang nantinya mengakibatkan air dapat masuk melalui proses osmosis. Auksin dapat mengubah aktivitas pada enzim yang berperan dalam sintesis komponen-komponen dinding sel dan menyusun kembali dalam satu matriks dinding sel yang utuh sehingga akan berpengaruh terhadap berat sel (Abidin, 1990). Sementara itu, penambahan zat pengatur tumbuh sitokinin berperan untuk memacu pembelahan sel dalam jaringan meristematik. Sitokinin dapat secara langsung berperan dalam proses transkripsi dan translasi RNA dalam proses sintesis protein (Catala *et al.*, 2000). Renicha (2016) menambahkan bahwa keseimbangan efektivitas zat pengatur tumbuh auksin dan sitokinin eksogen sangat bergantung pada konsentrasi hormon auksin dan sitokinin endogen didalam jaringan tumbuhan tersebut.

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa penggunaan kombinasi konsentrasi NAA dan BAP yang berbeda-beda dapat memberikan respon terhadap berat basah kalus yang berbeda-beda pula seperti pada penelitian Ragapadmi *et al* (2011) yang menghasilkan berat basah kalus tertinggi pada pemberian NAA 0,5 mg/l dan BAP 0,5 mg/l yaitu sebesar 844,4 mg. Pada penelitian Ludwi *et al* (2015) menghasilkan berat basah kalus tertinggi yaitu sebesar 3,55 gram pada penambahan BAP 1 ppm. Perbedaan berat basah yang dihasilkan ini disebabkan oleh jenis dan konsentrasi zat pengatur tumbuh yang diberikan juga berbeda-beda. Hal tersebut mempengaruhi berat basah kalus yang dihasilkan karena setiap sel memiliki respon masing-masing

terhadap zat pengatur tumbuh yang diberikan. Nurlaeni dan Surya (2015) mengemukakan bahwa pengaruh pemberian suatu konsentrasi zat pengatur tumbuh yang berbeda-beda pada setiap jenis tanaman, bahkan berbeda juga pada antar varietas dalam satu spesies. Keefektifitasan zat pengatur tumbuh pada tanaman dipengaruhi oleh konsentrasi yang diberikan, karena konsentrasi yang berbeda akan menimbulkan aktivitas yang berbeda pula.

Semakin optimum pemberian auksin dan sitokinin maka berat basah kalus yang dihasilkan akan tinggi, hal ini disebabkan oleh peningkatan kemampuan kalus dalam menyerap air (Wattimena, 1991). Auksin berpengaruh terhadap pertumbuhan dengan menginduksi sekresi ion H^+ keluar melalui dinding sel. Pengasaman dinding sel ini akan menyebabkan K^+ yang diambil akan mengurangi potensial air dalam sel dan mengakibatkan air mudah masuk di dalam sel dan kemudian sel akan membesar, sedangkan sitokinin yang ditambahkan akan melakukan pembelahan sel dan sintesis protein. BAP yang berfungsi sebagai sitokinin akan menyebabkan sel berproliferasi yang mengakibatkan bertambahnya berat kalus yang dihasilkan.

4.1.5 Berat Kering Kalus

Selain berat basah kalus, indikasi pertumbuhan kalus juga terdapat berat kering kalus. Berat kering merupakan gambaran akumulasi bahan organik dan mineral yang berperan penting bagi pertumbuhan kalus (Shofiyani dan Purnawanto, 2017). Hasil data berat kering kalus didapatkan dengan cara menimbang kalus yang telah dikeringkan dalam oven pada suhu $40^{\circ}C$. Sitompul dan Gurtino, (1995) mengemukakan bahwa proses pengeringan pada kalus memiliki tujuan untuk menghentikan aktivitas metabolisme yang ada pada sampel. Hal ini jelas berbeda dengan pengukuran pada berat segar yang masih dipengaruhi oleh aktivitas

metabolisme, yang menyebabkan kesulitan dalam pengukuran berat yang konstan.

Data hasil berat kering kalus dapat dilihat pada tabel 4.6

Tabel 4.6 Hasil Berat Kering Kalus

Perlakuan	Rata-Rata ± Standar Deviasi (gram)	Nilai Uji <i>Kruskal Wallis</i> ($\alpha=5\%$)
A	0	
B	0,083 ± 0,031	
C	0,046 ± 0,023	
D	0,090 ± 0,036	0,030
E	0,055 ± 0,003	
F	0,060 ± 0,018	
G	0,064 ± 0,027	
H	0,252 ± 0,246	
I	0,024 ± 0,010	

Keterangan A= NAA (0 ppm) + BAP (0 ppm)(Kontrol), B= NAA (2 ppm) + BAP (1,5 ppm), C= NAA (2 ppm) + BAP (1 ppm), D= NAA (4 ppm) + BAP (0,5 ppm), E= NAA (4 ppm) + BAP (1,5 ppm), F= NAA (4 ppm) + BAP (1 ppm), G= NAA (6 ppm) + BAP (0,5 ppm), H= NAA (6 ppm) + BAP (1,5 ppm), I= NAA (6 ppm) + BAP (1 ppm).

Berdasarkan **tabel 4.6**, dapat diketahui bahwa rata-rata berat kering kalus pada perlakuan (B) NAA (2 ppm) + BAP (1,5 ppm) yaitu sebesar 0,083 gram; perlakuan (C) NAA (2 ppm) + BAP (1 ppm) yaitu sebesar 0,046 gram; (D) NAA (4 ppm) + BAP (0,5 ppm) yaitu sebesar 0,090 gram; perlakuan (E) NAA (4 ppm) + BAP (1,5 ppm) yaitu sebesar 0,055 gram; perlakuan (F) NAA (4 ppm) + BAP (1 ppm) yaitu sebesar 0,060; perlakuan (G) NAA (6 ppm) + BAP (0,5 ppm) yaitu sebesar 0,064 gram; perlakuan (H) NAA (6 ppm) + BAP (1,5 ppm) yaitu sebesar 0,2524 gram; dan perlakuan (I) NAA (6 ppm) + BAP (1 ppm) yaitu sebesar 0,024 gram.

Data yang diperoleh kemudian dilakukan uji statistik dan diketahui bahwa data waktu pembentukan kalus tidak berdistribusi normal dan tidak homogen dilihat

dari hasil uji normalitas yang memiliki nilai ($0,000 < 0,05$) dan uji homogen yang memiliki nilai ($0,000 < 0,05$) (lampiran 18-19), sehingga dilanjutkan dengan uji *Kruskal Wallis* karena p value kurang dari taraf signifikansi ($\alpha=0,05$). Di dapati hasil uji *Kruskal Wallis* memiliki nilai *Asymp.Sig.* 0,030 yang memiliki arti terdapat perbedaan waktu dari pembentukan kalus tanaman insulin karena p value $< 0,05$ (Lampiran 20). Berdasarkan hasil *Asymp.Sig.* $0,030 < 0,05$ maka dapat dilakukan uji lanjutan menggunakan uji *Mann-Whitney*. Hasil uji *Mann-Whitney* menunjukkan bahwa terdapat perbedaan waktu pembentukan kalus pada beberapa perlakuan, ditandai dengan nilai *Asymp.Sig.* $< 0,05$ yang dapat dilihat pada tabel 4.7

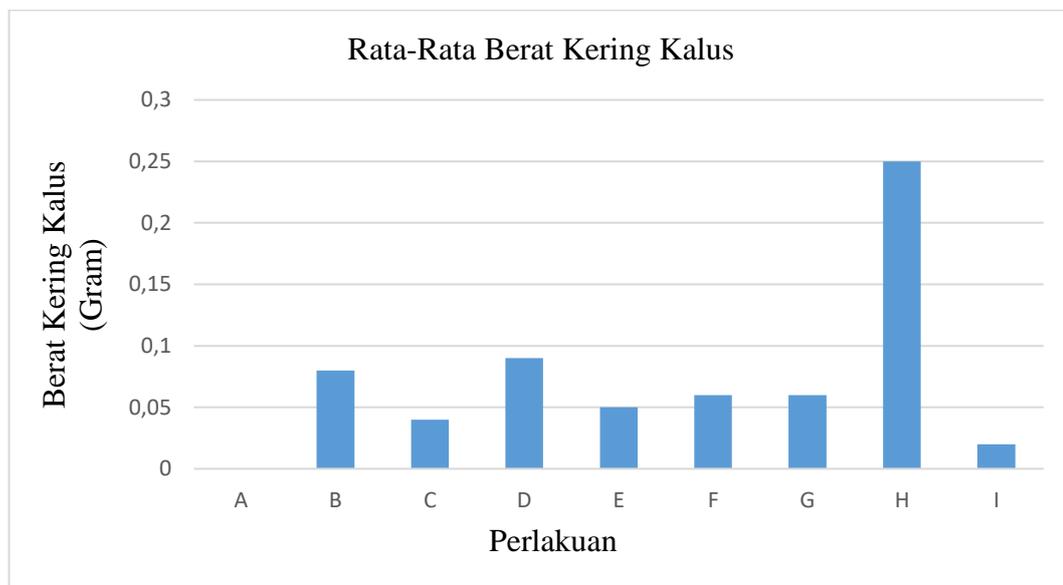
Tabel 4.7 Hasil Uji *Mann-Whitney* Berat Kering Kalus

Perlakuan	A	B	C	D	E	F	G	H	I
A		0,010*	0,382	0,004*	0,51	0,27*	0,51	0,002*	0,571
B				0,757	0,537	0,719	0,537	0,607	0,45*
C				0,150	0,607	0,440	0,607	0,100	0,382
D					0,354	0,503	0,354	0,837	0,21*
E						0,797	0,100	0,258	0,165
F							0,797	0,382	0,165
G								0,258	0,12*
H									
I									

Keterangan A= NAA (0 ppm) + BAP (0 ppm)(Kontrol), B= NAA (2 ppm) + BAP (1,5 ppm), C= NAA (2 ppm) + BAP (1 ppm), D= NAA (4 ppm) + BAP (0,5 ppm), E= NAA (4 ppm) + BAP (1,5 ppm),F= NAA (4 ppm) + BAP (1 ppm), G= NAA (6 ppm) + BAP (0,5 ppm), H= NAA (6 ppm) + BAP (1,5 ppm), I= NAA (6 ppm) + BAP (1 ppm). *=perbedaan signifikan pada uji *Mann-Whitney* (p value $< 0,05$).

Berdasarkan **tabel 4.7**, dapat diketahui bahwa perlakuan A berbeda signifikan dengan perlakuan (B,D,F,dan H), perlakuan I berbeda signifikan dengan perlakuan (B,D, dan H) serta perlakuan H berbeda signifikan dengan perlakuan I dan C. Menurut Setiawati *et al.*, (2021) perbedaan yang signifikan ini dipengaruhi oleh kecepatan sel dalam membelah diri, kemudian memperbanyak diri hingga membesarnya sel. Kecepatan sel dalam membelah diri dipengaruhi oleh zat pengatur tumbuh yang ditambahkan ke dalam media. Gunawan (1994) menambahkan bahwa kemampuan kecepatan sel dalam membelah diri disebabkan

oleh beberapa faktor antara lain jenis media, cahaya, suhu, dan pH media serta adanya bahan tambahan lain. Berat kering kalus tertinggi pada penelitian ini yakni pada konsentrasi NAA (6 ppm) + BAP (1,5 ppm) yang dapat dilihat pada gambar 4.6



Gambar 4.6 Grafik Rata-Rata Berat Kering Kalus

Keterangan A= NAA (0 ppm) + BAP (0 ppm)(Kontrol), B= NAA (2 ppm) + BAP (1,5 ppm), C= NAA (2 ppm) + BAP (1 ppm), D= NAA (4 ppm) + BAP (0,5 ppm), E= NAA (4 ppm) + BAP (1,5 ppm), F= NAA (4 ppm) + BAP (1 ppm), G= NAA (6 ppm) + BAP (0,5 ppm), H= NAA (6 ppm) + BAP (1,5 ppm), I= NAA (6 ppm) + BAP (1 ppm).

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa penggunaan kombinasi konsentrasi zat pengatur tumbuh yang diberikan dapat memberikan respon berbeda-beda pada penelitian Adil Jawad *et al* 2018 yang menggunakan konsentrasi NAA 1 mg/L dan BAP 1 mg/L pada tanaman *Stevia rebaudiana* menghasilkan berat kering 0,25 gram, dan pada penelitian Arkan setiaji *et al* 2020 yang menginduksi kalus pada tanaman Tomato pada pengaplikasian 2 mg/L BAP dan 0,2 mg/L NAA menghasilkan berat kering 2,70 gram. Perbedaan berat kering kalus yang dihasilkan dikarenakan konsentrasi zat pengatur tumbuh yang digunakan juga berbeda-beda. Zat pengatur tumbuh auksin seperti NAA berperan dalam peningkatan sintesa protein, dengan demikian maka NAA dapat digunakan sebagai sumber tenaga

dalam pertumbuhan (Ellok, 2016). Sedangkan sitokinin berperan dalam pembelahan sel serta mengatur pertumbuhan dan perkembangan. Dalam proses induksi kalus penggunaan zat pengatur tumbuh auksin dan sitokinin harus diberikan secara seimbang, guna menghasilkan kalus yang optimal. Gunawan (1992) menambahkan bahwa penggunaan penambahan zat pengatur tumbuh dalam media diduga dapat mempengaruhi metabolisme RNA yang berperan dalam sintesis protein melalui transkripsi molekul RNA, peningkatan yang terjadi merupakan sumber tenaga yang dapat digunakan sebagai pertumbuhan. Hal itulah yang dapat membuat berat kering kalus mengalami peningkatan.

Allah SWT telah menciptakan berbagai jenis tanaman dimuka bumi ini. Sungguh betapa besar kuasa-Nya, Allah menciptakan segala macam ciptaan yang tidak sia-sia. Salah satunya dalam menciptakan suatu tanaman. Allah menciptakan tanaman karena memiliki manfaat yang banyak sekali hingga dapat dimanfaatkan oleh makhluk hidup lainnya. Salah satunya dapat digunakan sebagai bahan pengobatan. Tanaman sendiri umumnya memiliki berbagai macam jenis dan spesies yang tersebar diseluruh dunia dalam jumlah terkecil hingga terbesar. Sebagaimana dalam QS. Lukman 31 ayat 10 yang menjelaskan tentang bagaimana kekuasaan Allah SWT dalam menciptakan keanekaragaman jenis tanaman yang bermanfaat.

خَلَقَ السَّمَاوَاتِ بِغَيْرِ عَمَدٍ تَرَوْنَهَا ۗ وَاللَّيْلِ فِي الْأَرْضِ رَوَاسِي أَنْ تَمِيدَ بِكُمْ وَبَثَّ فِيهَا مِنْ كُلِّ دَابَّةٍ ۗ وَأَنْزَلْنَا مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ

Artinya: ‘*Dia menciptakan langit tanpa tiang yang kamu melihatnya dan Dia meletakkan gunung-gunung (di permukaan) bumi supaya bumi itu tidak menggoyangkan kamu; dan memperkembang biakkan padanya segala macam jenis binatang. Dan Kami turunkan air hujan dari langit, lalu Kami tumbuhkan padanya segala macam tumbuh-tumbuhan yang baik*’.

Menurut Al-Quthubi (2009) yang dimaksud dalam tumbuhan yang baik ialah tumbuhan yang memiliki bentuk, warna, hingga manfaat. Salah satu tanaman yang bermanfaat ialah Tanaman Insulin. Melihat adanya banyak manfaat yang diberikan oleh tanaman insulin, maka perlu dilakukan upaya untuk memperbanyak tanaman ini dengan waktu yang singkat melalui *kultur in vitro*. Beberapa faktor yang dapat menunjang dalam pertumbuhan tanaman kultur yakni penggunaan media dan zat pengatur tumbuh yang sesuai dengan takaran, sebagaimana Allah SWT berfirman dalam QS. Al-Qamar 54 ayat 49:

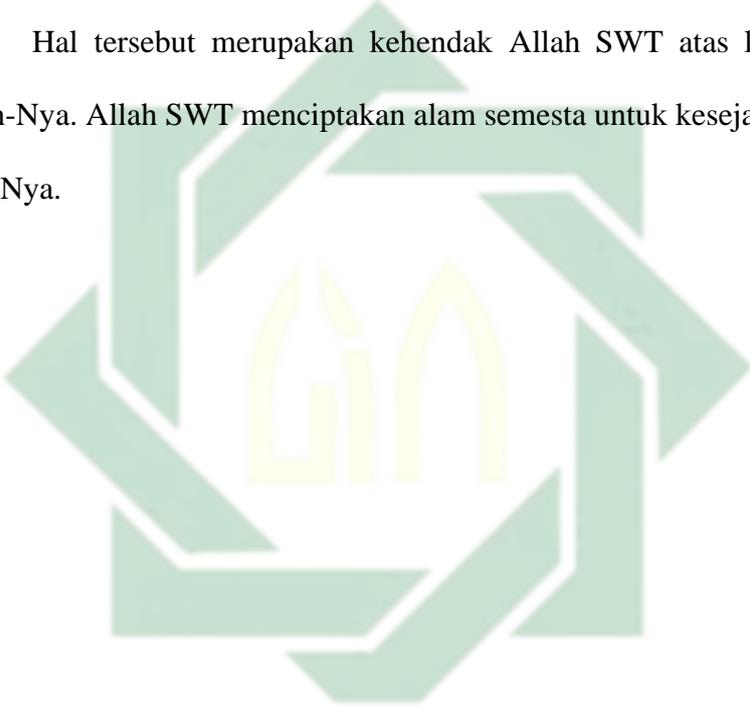
إِنَّا كُلَّ شَيْءٍ خَلَقْنَاهُ بِقَدَرٍ

Artinya: “*Sungguh, Kami menciptakan segala sesuatu menurut ukuran*”.

Menurut Al-Sheikh (2007) dalam tafsir Ibnu Katsir mengemukakan bahwa, segala sesuatu di muka bumi diciptakan oleh Allah SW terhadap semua makhluk sesuai dengan ukuran atau ketetapan dari-Nya. Allah SWT menciptakan segala sesuatu disertai dengan takdir yang telah ditetapkan Allah untuknya. Penelitian ini menggunakan media dan zat pengatur tumbuh untuk menginduksi kalus tanaman insulin yakni media MS yang dikombinasikan dengan zat pengatur tumbuh NAA dan BAP. Dapat diketahui hasil dari penelitian ini bahwa perlakuan kombinasi NAA dan BAP yakni (4 ppm) + BAP (1 ppm) merupakan perlakuan efektif terhadap indikator waktu pembentukan kalus dengan rerata 14,3 HST. Perlakuan kombinasi NAA (6 ppm) + BAP (1,5 ppm) yaitu sebesar 0,2524 gram merupakan perlakuan paling efektif terhadap indikator berat kering kalus. Sedangkan perlakuan paling efektif terhadap indikator berat basah kalus yakni pada konsentrasi kombinasi antara NAA 4 ppm + BAP 0,5 ppm yaitu sebesar 1,5322

gram. Dari hal tersebut dapat diketahui bahwa dalam meningkatkan pertumbuhan kalus tanaman insulin, maka dibutuhkan konsentrasi yang sesuai.

Hasil penelitian yang dihasilkan dapat membuktikan bahwa Allah SWT telah menunjukkan tahapan kehidupan dalam tanaman. Allah SWT yang telah menumbuhkan tanaman dari potongan daun insulin yang akan tumbuh menjadi kalus dan nantinya akan bertumbuh serta dapat menghasilkan senyawa metabolit sekunder. Hal tersebut merupakan kehendak Allah SWT atas kekuasaan dan kebesaran-Nya. Allah SWT menciptakan alam semesta untuk kesejahteraan semua makhluk-Nya.



UIN SUNAN AMPEL
S U R A B A Y A

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa:

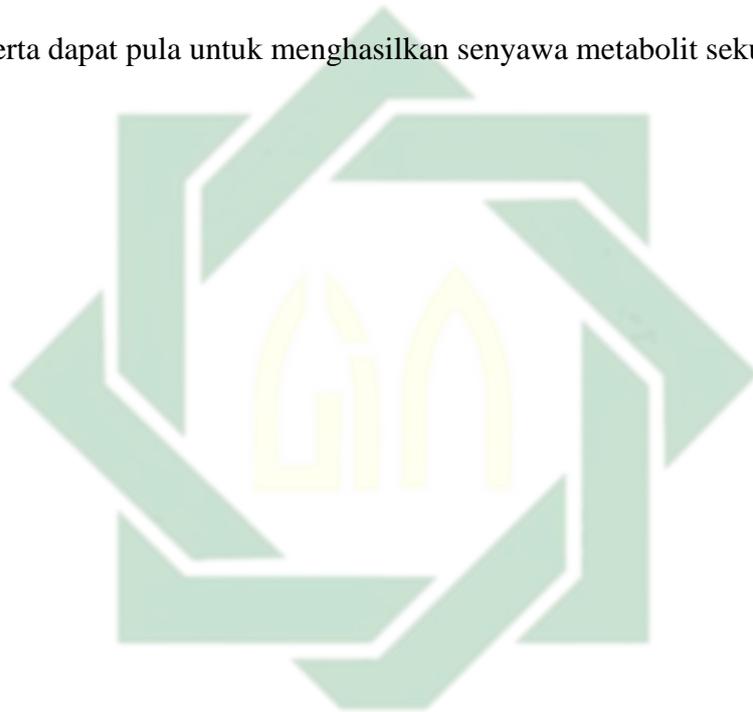
1. Berbagai kombinasi zat pengatur tumbuh auksin (NAA) dan sitokinin (BAP) memiliki pengaruh yang signifikan terhadap waktu pembentukan kalus dan berat kering kalus. Warna dan tekstur kalus yang dihasilkan didominasi oleh warna putih kehijauan dan bertekstur remah. Pada pengamatan anatomi kalus terdapat persamaan pada tekstur kalus kompak dan remah, yakni hanya terlihat sitoplasma dan dinding sel saja. Sedangkan pada data hasil waktu pembentukan kalus, berat basah dan berat kering kalus terdapat perbedaan.
2. Kombinasi zat pengatur tumbuh auksin (NAA) dan sitokinin (BAP) yang optimal dalam menginduksi kalus terdapat pada parameter waktu pembentukan kalus pada perlakuan NAA 4 ppm + BAP 1,5 ppm yang menghasilkan waktu tercepat yaitu 14,3 HST, parameter berat basah kalus pada perlakuan NAA 4 ppm + BAP 0,5 ppm yang menghasilkan berat basah tertinggi yaitu 1,5322 gram, dan parameter berat kering kalus pada perlakuan NAA 6 ppm + BAP 1,5 ppm yang menghasilkan berat kering tertinggi yaitu 0,2524 gram.

5.2 Saran

1. Diperlukan penelitian lanjutan mengenai pengaruh kombinasi konsentrasi zat pengatur tumbuh (ZPT) auksin dan sitokinin terhadap induksi kalus tanaman insulin (*Thitonia diversifolia* (Hemsl)) menggunakan konsentrasi

yang sama atau menggunakan zat pengatur tumbuh yang berbeda dan juga dilakukan identifikasi morfologi tanaman insulin (*Thitonia diversifolia* (Hemsl)) untuk mengetahui bagaimana pengaruh pemberian zat pengatur tumbuh (ZPT) yang diberikan pada morfologi daunnya.

2. Hasil kombinasi zat pengatur tumbuh auksin (NAA) dan sitokinin (BAP) yang optimal dapat digunakan sebagai penelitian lanjutan untuk regenerasi serta dapat pula untuk menghasilkan senyawa metabolit sekunder.



UIN SUNAN AMPEL
S U R A B A Y A

DAFTAR PUSTAKA

- Amanatie dan Eddy Sulistyowati. 2015. Structure Elucidation of the Leaf of *Tithonia diversifolia* (Hemsl) Gray. *Jurnal Sains dan Matematika*. 23 (4): 101-106.
- Andaryani, S. 2010. Kajian Penggunaan Berbagai Konsentrasi BAP dan 2,4-D Terhadap Induksi Kalus Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L.) Secara In Vitro. *Skripsi*. Faperta Universitas Sebelah Maret. Surakarta.
- Asmono, S. L. Dan V. K. Sari. 2016. Induksi Kalus dari Beberapa Kultivar Tanaman Kentang (*Solanum tuberosum* L.) Dataran Medium secara In Vitro Menggunakan Variasi Konsentrasi 2,4-D. *Jurnal Ilmiah Inovasi*. 1(2): 116-121.
- Al-Qurthubi, S,I. 2009. *Tafsir Al-Qurthubi*. Jakarta Selatan. Pustaka Azzam.
- Al-Sheikh, A. diterjemahkan oleh Ghoffar, M. 1994. Tafsir Ibnu Katsir Jilid 6. Kairo: Mu'assasah Daar- al-Hilaal.
- Ariati, S.N. 2012. Induksi Kalus Tanaman Kakao (*Theobroma cacao* L.) Pada Media Ms Dengan Penambahan 2,4-D, BAP dan Air Kelapa. *Jurnal Natural Science*. 1(1): 78-84.
- Abidin. 1985. *Dasar-Dasar Pengetahuan Zat Pengatur Tumbuh*. Bandung. Angkasa.
- Abidin, Z. 1990. *Dasar-Dasar Pengetahuan Tentang Zat Pengatur Tumbuh*. Penerbit Angkasa, Bandung.
- Amalina Wahyuni, Benni Satria, Aprizal Zainal. 2020. Induksi Kalus Gaharu dengan NAA dan BAP Secara In Vitro. *Jurnal Penelitian Agronomi*. 22(1): 39-44.
- Ajjiah N., Tasman, I. M., Hadipoentyanti, E. (2010). Induksi Kalus Vanili (*Vanilla planifolia* ANDREW). Dari Eksplan Daun dan Buku. *Buletin RISTRI*. (5).
- Ana Karunia Illahi, Evie Ratnasari, dan Sari Kusuma Dewi. 2022. Pengaruh 2,4-D Terhadap Pertumbuhan Kalus Daun *Diospyros discolor* Wild pada Media MS secara in Vitro. *Lentera Bio*. 11(3): 369-377.
- Afriandi Dwi Kristianto dan Titin Setyorini. 2021. Induksi Kalus Eksplan Daun Lada (*Piper nigrum* L.) pada Modifikasi Media MS dengan Penambahan Hormon NAA Dan BAP. *AGRITECH*. Vol. XXIII.
- Adil Jawad, Muhammad Naafe, Skandar Aman, and Adil Khan. 2018. Effect of Plant Growth Regulators on Callus Formation In *Stevia rebaudiana*. *International Journal of Environmental Sciences & Natural Resources*. 14(4).
- Arkan Setiaji, RR Rifka Annisa, Rumiati, and Endang Semiarti. 2020. Effect of Different Strenght of Media on Germination and Seedling Growth of *Tomato* and Sucrose Effect on Biomass of Its Callus. *Jurnal BIOTA*. 6(1).
- Basri, Z. (2008). Multiplication of Four Varieties of *Chrysanthemum* through Tissue Culture Technique. *J. Agroland*. 15(4): 271-277. (In Indonesian).
- Catala, C., J. K. C. Rose, and A. B. Bennet. 2000. Auxin-Regulated Genes Encoding Cell Wall-Modifying Proteins are Expressed during Early Toato Fruit Growth. *Plant Physiology* . 122(2): 527-534.
- Didik, G., dan Sulistijowati, A,. 2001. *Efek Estrak Daun Kembang Bulan Terhadap Candida Albicans Serta Profil Kromatogramnya Dalam Cermin Dunia Kedokteran*. Jakarta, UI Press. Hal 31-32.

- Dinda Pangestika, Samanhudi, dan Eddy Triharyanto. 2015. Kajian Pemberian IAA dan Paclobutrazol Terhadap Pertumbuhan Eksplan Bawang Putih. *TKB*. 16 (IX).
- Dwi, N. M., Waeniarti, M. dan Suwastika, I. N. 2012. Pengaruh Penambahan Air Kelapa Dan Berbagai Konsentrasi Hormone 2,4-D Pada Medium Ms Dalam Menginduksi Kalus Tanaman Anggur Hijau (*Vitis vinifera* L.). *Jurnal Natural Science*. 1(1):53-62.
- Dewi, I.R. 2008. Peranan dan Fungsi Fitohormon bagi Pertumbuhan Tanaman. *Skripsi*. Fakultas Pertanian, Universitas Padjajaran, Bandung.
- Dr. Ir. Dwi Hapsoro, M.Sc. dan Prof. Dr. Ir. Yusnita, M.Sc. 2018. *Kultur Jaringan: Teori dan Praktik*. Penerbit ANDI.
- Dieni Fauziyyah, Triani Hardiyati, Kamsinah. 2018. Upaya Memacu Pembentukan Kalus Eksplan Embrio Kedelai (*Glycine max* (L.) Merrill) Dengan Pemberian Kombinasi 2,4-D dan Sukrosa secara Kultur In Vitro. *Jurnal Pembangunan Padesaan*. 12 (1): 30-37.
- Dian Eka Sari. 2018. Pengaruh 2,4-D dan BAP Dengan Berbagai Konsentrasi Terhadap Induksi Kalus Embriogenik Daun Wungu (*Graptophyllum pictum* L.Griff). *Skripsi*. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim, Malang.
- Enny Mutryarny, dan Seprita Lidar. 2018. Respon Tanaman PakCoy (*Brassica rapa* L.) Akibat Pemberian Zat Pengatur Tumbuh Harmonik. *Jurnal Ilmiah Pertanian*. 14 (2).
- Ellok Dwi Sulichantini. 2016. Pengaruh Konsentrasi Zat Pengatur Tumbuh Terhadap Regenerasi Bawang Putih (*Allium sativum* L.) Secara Kultur Jaringan. *Jurnal AGRIFOR*. XV(1).
- Fatmawati, T. A., T. Nurhidayati, dan N. Jadid. 2010. Pengaruh Kombinasi Zat Pengatur Tumbuh IAA dan BAP pada Kultur Jaringan Tembakau Nicotina tabacum L. VAR. Prancak 95. *Jurnal Fakultas Matematika Ilmu Pengetahuan Alam*.
- Gunawan, L.W. 1992. *Teknik Kultur Jaringan*. Pusat Antar Universitas IPB. Bogor.
- Gunawan, L.W. 1998. *Teknik Kultur Jaringan Tumbuhan*. Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan dan Kebudayaan. Jakarta. 304.
- Gunawan, L, W., 1994. *Teknik Kultur Jaringan Tumbuhan* . PAU Bioteknologi, Bogor. Institut Pertanian Bogor.
- George, E.F., dan P.D. Sherrington. 1984. *Plant Propagation by Tissue Culture*. Exegetics Limited. England.
- George, E. F., and de Klerk G.J., 2008. The Component of Plant Tissue Culture Media 1: Macro and Micro Nutrients, *Plant Propagation Tissue Culture 3rd Edition 1*. Springer, Netherland.
- Ganitha Kamilia, Elok Dwi Sulichantini, dan Penny Pujowati. 2019. Pengaruh Pemberian Berbagai Bahan Zat Pengatur Tumbuh Alami Pada Pertumbuhan Bibit Cempedak (*Artocarpus champeden* Lour.) Seeds. *Jurnal Agroteknologi Tropika Lembab*. 2(1): 20-23.
- Hutapea, J. 1994. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia*. Jakarta. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan. Jakarta. Hal 297.
- Hendaryono D.P dan A. Wijayanti. 1994. *Teknik Kultur Jaringan: Pengenaan dan Petunjuk Perbanyakkan Tanaman Secara Vegetatif-Modern*. Yogyakarta. Kanisius.

- H. A Kadir, HJ. Murdiningsih, HJ. Diah Sukarni. 2016. Pengaruh Air Rebusan Daun Tumbuhan Insulin (*Thitonia Diversifollia*) terhadap Kadar Glukosa Darah pada Penderita Diabetes Mellitus di kota Palembang Tahun 2016. *Jurnal Kesehatan*. XI (2).
- Harianto, W. 2009. *Pengenalan Teknik In Vitro*. Jakarta. Penebar Swadaya.
- Hariani. 2018. Pertumbuhan Tanaman Krisan (*Chrysanthemum morifolium*) Varietas Naweswari Agrihorti Pada Variasi Konsentrasi Ekstrak Kecambah Kacang Hijau Pada Media MS (*Murashige and Skoog*). Skripsi. Fakultas Sains dan Teknologi, UIN Alauddin Makassar, Makassar.
- Hikmah Fitriani. 2008. Kajian Konsentrasi BAP dan NAA Terhadap Multiplikasi Tanaman *Artemisia annua* L. Secara In Vitro. *Skripsi*. Fakultas Pertanian, Universitas Sebelas Maret.
- Hapsari D dan Yusnita Y. 2016. *Kultur Jaringan untuk Perbanyak Klonal Kelapa Sawit (Elaeisis guineensis Jacq)*. Bandar Lampung. CV. Anugrah Utama Raharja.
- Indah, N., dan Ermavitalini, D. 2013. Induksi Kalus Daun Nyamplung (*Calophyllum inophyllum* Linn). Pada beberapa kombinasi konsentrasi 6-Benzylaminopurine (BAP) dan 2,4-Dichlorophenoxyatic Acid (2,4-D). Surabaya. *Jurnal Sains dan Seni Pomits*. 2(1): 2337-3520.
- Imam Mahadi, Wan Syafi'i dan Yeni Sari. 2016. Pengaruh Pemberian Hormon 2,4-D dan BAP Terhadap Pertumbuhan Kalus Jeruk Kasturi (*Citrus microcarpa*). *Jurnal Biogenesis*. 12(2): 99-104.
- Johnson RJ, Perez-Posa SE, Sautin YY, Manitius J, Lozada LG, Feig DI, et al. 2009. Hypothesis: Could excessive fructose intake and uric acid cause type 2 diabetes. *Endocr Rev*. 30(1): 96-106.
- Junairiah, Nabilah Istighfari Zuraidassanaaz, Fairuz Nabil Izdihar, dan Yosephine Sri Wulan Manuhara. 2017. Callus Induction of Leaf Explant *Piper betle* L. Var Nigra with Combination of Plant Growth Regulators *Indole-3-Acetic Acid* (IAA), *Benzyl Amino Purin* (BAP) and Kinetin. *AIP Conference Proceedings*.
- Khaniyah, S., N.A., Habibah dan Sumadi. 2017. Pertumbuhan Daun Mahkota Dewa (*Gynura procumbens* Lour Merr) Dengan Kombinasi 2,4-D dan Kinetin Secara *in Vitro*. *Biosanintifika*. 4 (2).
- Karjadi, A.K. dan Buchory A. 2008. Pengaruh Auksin dan Sitokinin terhadap Pertumbuhan dan Perkembangan Jaringan Meristem Kentang Kultivar Granola. *Jurnal Hort*. 4(1).
- Kezia Prashariska, Ari Pitoyo, dan Solichatum. 2021. Pengaruh *Indole-3-Acetic Acid* (IAA) dan *Benzyl Amino Purine* (BAP) Terhadap Induksi dan Deteksi Alkaloid Kalus Kamilen (*Matricaria chamomilla* L.). *Jurnal Inovasi Pertanian*. 23(2).
- Lestari, E. G., Tutik, N. dan Siti, N. 2013. Pengaruh Konsentrasi ZPT 2,4-D dan BAP terhadap Pertumbuhan dan Perkembangan Biji *Dendrobium laxiflorum* J.J Smith secara In Vitro. *Jurnal Sains Dan Seni Pomits*. 2(1). 2337-3520.
- Massa, G. N. O. 2016. Pengaruh Variasi Konsentrasi Zat Pengatur Tumbuh *Dichlorophenoxyacetic Acid* (2,4-D) dan *Benzyl Adenine* (BA) Terhadap Induksi dan Kandungan Senyawa Metabolit Sekunder Kalus Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz dan Pav.). *Skripsi*. Universitas Airlangga, Surabaya.

- Monikhatul Qudriyyah. 2018. Induksi Kalus Kompak Ciplukan *Physalis angulata* Dengan Pemberian Zat Pengatur Tumbuh *Diclorophenoxyacetic acid* (2,4-D) dan *6-Benzyl Amino Purin* (BAP) Secara In Vitro. *Skripsi*. Universitas Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Nasir, M., 2002. *Bioteknologi Potensi dan Keberhasilannya dalam Bidang Pertanian*. Jakarta. Grafindo Persada.
- Nursyamsi. 2010. Teknik Kultur Jaringan Sebagai Alternatif Perbanyak Tanaman untuk Mendukung Rehabilitasi Lahan. Di dalam : Makalah pada Ekpose Hasil-Hasil Penelitian Balai Penelitian Kehutanan. *Prosiding Ekpose*; Makassar, 22 Juni 2010. 85-100.
- Nurhayati Anwar dan Mayta Novaliza Isda. 2020. Respons Pembentukan Kalus Daun Pegagan (*Centella Asiatica* (L.) Urb.) dengan Penambahan Naphtalene Acetic Acid dan Benzil Amino Purin secara *In Vitro*. *Biota: Jurnal Ilmiah Ilmu-Ilmu Hayati*. Vol. 5 (2): 136-142.
- Nisak, K., Nurhidayati, T., & Purwani, K.I. 2012. Pengaruh Kombinasi Konsentrasi ZPT NAA dan BAP Pada Kultur Jaringan Tembakau *Nicotiana tabacum* Var. Prancak 95. *Jurnal Sains dan Seni Pomits Science Research*. 8(7): 1-6.
- Ni Kadek Dwipayani Lestari, Ni Wayan Deswiniyanti, Ida Ayu Astarini, dan Ni Luh Made Arpiwi. 2019. Callus and shoot induction of leaf culture *Lilium longiflorum* with NAA and BAP. *Nusantara Bioscience*. 11(2): 162-165.
- Prizka Putri Pahlawan dan Dwita Oktaria. 2016. Manfaat Daun Insulin (*Smallanthus sonchifolius*) sebagai Antidiabetes. *MAJORITY*. 5 (4).
- Pierik, R.L.M. 1997. *In vitro culture of higher plants*. Martinus Nijhoff Publisher Dordrecht. 344.
- Polreich Severin. 2003. *Establishment of a classification scheme to structure the post-harvest diversity of yacon storage roots (Smallanthus sonchifolius (poep. & endl.) H. Robinson)*. Lima, Peru : University of Kassel.
- Prizka Putri Pahlawa, & Dwita Oktaria. 2016. Manfaat Daun Insulin (*Smallanthus sonchifolius*) sebagai Antidiabetes. *Jurnal MAJORITY*. 5 (4).
- Purwani, K., Nurhidayati, Tutik dan Nisak. 2012. Pengaruh Kombinasi Konsentrasi ZPT NAA dan BAP pada Kultur Jaringan Tembakau *Nicotiana*. *Jurnal Sains dan Serni Pormits*. 1(1). 1-6.
- Putro Aji Pramono. 2017. Induksi Kalus Jintan Hitam (*Nigella sativa* L.) Dengan Menggunakan Kombinasi Zat Pengatur Tumbuh 2,4-D dan Kinetin Melalui Teknik Kultur Jaringan. *Skripsi*. Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim, Malang.
- Poonsapaya, P.M.W, Nabors, W. Kersi, and M. Vajrabhaya. 1989. A comparison of methods for callus culture and plant regeneration of RD-25 rice (*Oryza sativa* L.) in vitro laboratoris. *Plant Cell Tiss. Org. Cult*. 16:175-186.
- Purwaningsih, W., R. Kusdianti, dan Y. Linda. 2007. Anatomi Kalus yang Berasal dari Eksplan Daun *Catharanthus roseous* (L). G. Don (Tapak Dara). *Jurnal Seminar Nasional Bioteknologi*.
- Queen KA Marthani, Yustinus U Anggraito, dan Enni S Rahayu. 2016. Kalogenesis Eksplan Setengah Biji Koro Benguk (*Mucuna pruriens* L.) Secara In Vitro Menggunakan BAP dan NAA. *Jurnal Life Science*. 5(1).
- Rahayu, B., Solichatun dan Anggarwulan, E. 2003. Pengaruh Asam 2,4-Diklorofenoksiasetat (2,4-D) Terhadap Pembentukan Dan Pertumbuhan

- Kalus Serta Kandungan Flavonoid Kultur Kalus *Acalypha indica* L. *Biofarmasi*. 1(1). 1-6.
- Rolim PM, Salgado SM, Padilha VM, Andrane SA. *Glyemic profile and prebiotic potential of breas with flour yacon*. *Cienc. Tecnol. Aliment. Campina*. 31 (2). 467-474.
- Renicha. 2016. Analisis Metabolit Sekunder Hasil Kultur Eksplan Daun Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) pada Medium Murashige & Skoog (Ms) dan Gamborg (B5). *Skripsi*. Universitas Pendidikan. Jakarta.
- Riska Aqidatud Dzaroini. 2019. Induksi Kalus Daun Mangkokan (*Nothopanax scutellarium* Merr.) Menggunakan Zat Pengatur Tumbuh NAA (*Naphtalene Acetic Acid*) dan BAP (*6-Benzyl Amino Purine*) Melalui Teknik In Vitro. *Skripsi*. Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim, Malang.
- Ragapadmi Purnamaningsih dan Misky Ashrina. 2011. Pengaruh BAP dan NAA Terhadap Induksi Kalus dan Kandungan ARTEMISININ dari *Artemisia annua* L. *Berita Biologi*. 10(4).
- Rinaldi Sjahril. 2016. Performance of NAA, 2iP, BAP and TDZ on Callus Multiplication, Shoots Initiation and Growth for Efficient Plant Regeneration System in Chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.). *International Journal of Agriculture System (IJAS)*. 4(1).
- S.A. Sulistijowati, D. Gunawan. 2001. *Efek Ekstrak Daun Kembang Bulang (Tithonia diversifolia A. Gray.) Terhadap Candida albicans serta Profil Kromatografinya*, in: *Media Penelitian dan Pengembangan Kesehatan*. Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Sitinjak, M.A., Isda, Mayta N. dan Fatonah, Siti. 2015. Induksi Kalus dari Eksplan Daun In Vitro Keladi Tikus (*Typhonium* sp.) dengan Perlakuan 2,4-D dan Kinetin. *Jurnal Biologi Al-Kauniyah*. 8(1). 32-39.
- Syahid, Fatimah, S., Natalini, N.K., & Deliah, S. 2010. Pengaruh Komposisi Media Terhadap Pertumbuhan Kalus dan Kadar Tannin dari Daun Jati Belanda (*Guazuma ulmifolia* Lamk) secara In Vitro. *Jurnal Litri*. 16(1): 1-5.
- Shofiyani, Anis dan Agus Mulyanto Purnawanto. 2017. Pertumbuhan Kalus Kencur (*Kaemferia galangal* L.) Pada Komposisi Dengan Perlakuan Sukrosa dan Zat Pengatur Tumbuh (2,4-D dan *Benzyl Amino Purine*). *Agritech*. XXX (1): 55-64.
- Suliansyah. 2013. *Kultur Jaringan Tanaman*. Yogyakarta. Leutikaprio.
- Santoso U, dan Nursandi F. 2002. *Kultur Jaringan Tanaman*. Malang. UMM Press.
- Santoso U, dan Nursandi F. 2004. *Kultur Jaringan Tanaman*. Malang. UMM Press.
- Santoso U, dan Nursandi F. 2003. *Kultur Jaringan Tanaman*. Malang. UMM Press.
- Sitompul, S. M., dan Guritno, B. 1995. *Analisis Pertumbuhan Tanaman*. Gadjah Mada Unersity Press, Yogyakarta.
- Sallisbury, F.B. and Ross, C.W. 1995. *Fisiologi Tumbuhan Jilid 4*. Bandung. ITB.
- Suprpto, A. 2004. Auksin : Zat Pengatur Tumbuh Penting Meningkatkan Mutu Stek Tanaman. *Magelang : Fakultas Pertanian Universitas Tidar Magelang*. 21(1).
- Silva, J. A. T. 2012. Is BA (6-Benzyladenine) BAP (6-Benzylaminopurine)?. *The Asian and Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology*. 20(4). 121-124.

- Silalahi, M. 2015. Pengaruh Modifikasi Media Murashige-Skoog (MS) dan Zat Pengatur Tumbuh BAP terhadap Pertumbuhan Kalus *Centella asiatica* L.(Urban.). *Jurnal Pro Life* .2(1): 14-23.
- Setiawati, T., A. L. Astuti, M. Nurzaman, dan N. Ratningsih. 2021. Analisis Pertumbuhan dan Kandungan Total Flavonoid Kultur Kalus Krisan (*Chrysanthemum morifolium* Ramat) dengan Pemberian Asam 2,4-Diklorofenoksiasetat (2,4-D) dan Air Kelapa. *Jurnal Pro-Life: Jurnal Pendidikan Biologi, Biologi, dan Ilmu Serumpun* .8(1): 32-34.
- Shifeng Li, Yanming Shen, Min Xiao, Dongbin Liu, Lihui Fan, and Zhigang Zhang. 2014. Research Article Simultaneous Intercalation of *1-Naphthylacetic Acid* and *Indole-3-butyric Acid* into Layered Double Hydroxides and Controlled Release Properties. *Journal of Nanomaterials*. 9.
- Samuel Bram Sainawal, Julius D. Nugroho, dan Francia F. Kesaulija. 2017. Kultur Embrio Merbau (*Intsia bijuga* OK.) pada media Murashige & Skoog (MS) Diperkaya Dengan Zat Pengatur Tumbuh BAP, GA₃, dan IBA. *Jurnal Kehutanan Pampusia*. 3(2). 132-141.
- Sudoyo, A. W., Setiyohadi, B., Alwi, I., Simadibrata, M., & Setiati, S. (2015). Buku ajar ilmu penyakit dalam. *Edisi Ke-4. Pusat Penerbitan Ilmu Penyakit Dalam FKUI*. Jakarta. 1218-20.
- Street, H.E. 1993. *Plant Tissue and Cell Culture*. University Of California Press. Los Angeles.
- Suci Khairani Safitri, Luthfi A.M. Siregar, dan Khairunnisa Lubis. (2017). Induksi Kalus Tanaman Rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) pada Jenis Eksplan dan Konsentrasi Auksin yang Berbeda. *Jurnal Agroetnologi FP USU*. 5(3): 593-598.
- Suheb, N. A. 2018. Induksi Kalus *Agave sisalana* pada Media MS dengan Kombinasi Konsentrasi *6-Benzylaminopurin* (BAP) dan *2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid* (2,4-D). *Skripsi*. Universitas Muhammadiyah Malang, Malang.
- Shabeer Ahmad Dar, Irshad Ahmad Nawchoo, Sumira Tyub, dan Azra Nahaid Kamili. 2021. Effect of plant growth regulators on in vitro induction and maintenance of callus from leaf and root explants of *Atropa acuminata* Royal ex Lindl. *Biotechnology Reports*. 21.
- Samudin, S. 2009. Pengaruh Kombinasi Auksin-Sitokinin Terhadap Pertumbuhan Buah Naga. *Media Litbag Sulteng*. 2(1):62-66.
- Tantri Swandari dan Titin Setyorini. 2017. Induksi Kalus *Gerbera jamesonii* dengan Kombinasi NAA dan BAP. *AGROISTA Jurnal Agroteknologi*. 1(2). 192-196.
- Tia Setiawati, Alma Ayalla, dan Anandira Witri. 2019. Induksi Kalus Krisan (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) Dengan Penambahan Berbagai Kombinasi Zat Pengatur Tumbuh (ZPT). *Jurnal EduMatSains*. 3(2): 119-132.
- Triana, F. 2015. Induksi Kalus Pada Eksplan Daun Tanaman Binahong (*Anredera cordifolia*) Secara In Vitro Dengan Konsentrasi 2,4-D dan BAP yang Berbeda. *Skripsi*. Surakarta: FKIP Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Taiz, L., & E. Zeiger. 2010. *Plant Physiology*. Edisi Kelima. Massachusetts: Sinauer Associates Ink.

- Widowati W. 2009. *Potensi antioksidan sebagai antidiabetes*. Bandung: Fakultas Kedokteran Universitas Kristen Maranatha.
- Wetter, L.R., dan Constabel, F., 1991. *Metode Kultur Jaringan Tanaman Edisi Kedua*. Institut Teknologi Bandung Press, Bandung.
- Welsh, J., R. 1991. *Dasar-Dasar Genetika dan Pemuliaan Tanaman*. Jakarta. Alih Bahasa J.P. Moge.
- Wiraatmaja IR. I. Wayan. 2017. *Zat Pengatur Tumbuh Auksin dan Cara Penggunaannya dalam Bidang Pertanian*. Program Studi Agroteknologi. Fakultas Pertanian. Universitas Udayana.
- Wattimena, G.A. 1988. *Bioteknologi Tanaman*. Bogor. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan. Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi.
- Wattimena. 1991. *Zat Pengatur Tumbuh Tanaman*. Bogor: PAU IPB.
- Winata. L. 1987. *Teknik Kultur Jaringan*. PAU Bogor. 252 hlm.
- Wardani, D.P., Solichatun dan Setiawan, Ahmad D. 2004. Pertumbuhan dan Produksi Saponin Kultur Kalus *Talinum paniculatum* Gaertn. Pada Variasi Penambahan Asam 2,4-Diklorofenoksi Asetat (2,4-D) dan Kinetin. *Bioformasi*. 2(1): 35-63.
- Yusnita. 2003. *Kultur Jaringan Cara Memperbanyak Tanaman Secara Efisien*. Jakarta. Agromedia Pustaka.
- Yuwono, T., 2006. *Bioteknologi Pertanian*. Yogyakarta. Gadjah Mada University Press.
- Yulianti Rasud, dan Bustaman. 2020. Induksi Kalus secara In Vitro dari Daun Cengkeh (*Syzigium aromaticum* L.) dalam Media dengan Berbagai Konsentrasi Auksin. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia (JIPI)*. 25 (1). 67-72.
- Zulkarnain. 2009. *Kultur Jaringan Tanaman; Solusi Perbanyak Tanaman Budi Daya*. Bumi Aksara. Jakarta.
- Zulkarnain. 2014. *Solusi Perbanyak Tanaman Budidaya Kultur Jaringan Tumbuhan*. Bumi Aksara. Jakarta.
- Zaer, J. S. dan Mapes M. O. 1985. *Action of Growth Regulators*. Hal 231-255.

UIN SUNAN AMPEL
S U R A B A Y A