

**PENGARUH ELISITOR $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ TERHADAP PERTUMBUHAN SERTA
PRODUKSI FLAVONOID DAN FENOLIK KULTUR KALUS TANAMAN
INSULIN (*Tithonia diversifolia*)**

SKRIPSI



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

Disusun oleh:

**FADILAH
NIM: H71219023**

**PROGRAM STUDI BIOLOGI
JURUSAN SAINS
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI SUNAN AMPEL SURABAYA
SURABAYA
2023**

PERNYATAAN KEASLIAN

PERNYATAAN KEASLIAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini,

Nama : Fadilah

Nim : H71219023

Program Studi : Biologi

Angkatan 2019

Menyatakan bahwa saya tidak melakukan plagiat dalam penulisan skripsi saya yang berjudul "PENGARUH ELISITOR $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ TERHADAP PERTUMBUHAN SERTA PRODUKSI FLAVONOID DAN FENOLIK KULTUR KALUS TANAMAN INSULIN (*Tithonia diversifolia*)". 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, 26 Juni 2023

Yang menyatakan,



Fadilah
NIM. H71219023

HALAMAN PERSETUJUAN

HALAMAN PERSETUJUAN

Skripsi

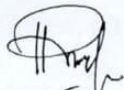
Pengaruh Elisitor $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ Terhadap Pertumbuhan Serta Produksi Flavonoid dan Fenolik Kultur Kalus Tanaman Insulin (*Tithonia diversifolia*)

Diajukan oleh:
Fadilah
NIM: H71219023

Telah diperiksa dan disetujui
Di Surabaya, 26 Juni 2023

Dosen Pembimbing Utama

Dosen Pembimbing Pendamping



Irul Hidayati, M.Kes
NIP. 198102282014032001



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

PENGESAHAN TIM PENGUJI SKRIPSI

PENGESAHAN TIM PENGUJI SKRIPSI

Skripsi Fadilah ini telah dipertabankan
di depan tim penguji skripsi
di Surabaya, 4 Juli 2023

Mengesahkan,
Dewan Penguji

Penguji I



Irul Hidayati, M.Kes
NIP. 198102282014032001

Penguji II



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

Penguji III



Saiku Rokhim, M.KKK
NIP. 198612212014031001

Penguji IV



Eva Agustina, M.Si
NIP. 198908302014032008

Mengetahui,
Dekan Fakultas Sains dan Teknologi
UIN Sunan Ampel Surabaya




Dr. A. Saepul Hamdani, M.Pd
NIP. 196507312000031002



UIN SUNAN AMPEL
S U R A B A Y A

KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI SUNAN AMPEL SURABAYA
PERPUSTAKAAN

Jl. Jend. A. Yani 117 Surabaya 60237 Telp. 031-8431972 Fax.031-8413300
E-Mail: perpus@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 : Fadilah
NIM : H71219023
Fakultas/Jurusan : Sains dan Teknologi/Biologi
E-mail address : 1511fadilah@gmail.com

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

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

Pengaruh Elisitor $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ Terhadap Pertumbuhan Serta Produksi Flavonoid dan Fenolik Kultur Kalus Tanaman Insulin (*Tithonia diversifolia*)

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, 10 Agustus 2023

Penulis

Fadilah

ABSTRAK
**PENGARUH ELISITOR $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ TERHADAP PERTUMBUHAN SERTA
PRODUKSI FLAVONOID DAN FENOLIK KULTUR KALUS TANAMAN
INSULIN (*Tithonia diversifolia*)**

Tithonia diversifolia merupakan tanaman obat yang memiliki aktivitas farmakologis akibat adanya kandungan flavonoid dan fenolik yang terkandung didalamnya. Banyak strategi yang digunakan untuk meningkatkan produksi senyawa metabolit tersebut. Penambahan elisitor abiotik merupakan strategi yang paling efektif untuk meningkatkan senyawa metabolit. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh elisitor $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ terhadap pertumbuhan serta produksi flavonoid dan fenolik total kultur kalus tanaman insulin. Kalus diinduksi dari eksplan daun. Eksplan diinokulasikan pada media inisiasi MS yang dilengkapi dengan 4 ppm NAA, 1,5 ppm BAP. 0,1 g kalus dipindahkan pada media perlakuan yang ditambahkan elisitor $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (1, 3, 5, dan 7 ppm). Kalus dipanen setelah 15 hari subkultur untuk diamati warna, tekstur, berat segar, berat kering, serta kandungan flavonoid dan fenolik. Kandungan flavonoid dan fenolik dianalisis kuantitatif menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kalus yang dihasilkan berwarna putih kekuningan, kuning kemerahan, putih kehijauan, dan kuning kecoklatan dengan tekstur remah dan kompak. Terdapat pengaruh yang signifikan terhadap berat segar dan berat kering kalus, dimana nilai rata-rata berat segar dan berat kering kalus tertinggi terdapat pada perlakuan 0 ppm yaitu sebesar 0,144397 gram dan 0,0575 gram. Kadar konsentrasi flavonoid dan fenolik tertinggi terdapat pada perlakuan 1 ppm yaitu sebesar 139,428 mg/L dan 77,687 mg/L.

Kata kunci: *Tithonia diversifolia*, flavonoid, fenolik, kultur kalus, tembaga sulfat

UIN SUNAN AMPEL
S U R A B A Y A

ABSTRACT
**EFFECT OF ELISITOR $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ON THE GROWTH AND
PRODUCTION OF FLAVONOIDS AND PHENOLIC CALLUS CULTURE
OF INSULIN PLANT (*Tithonia diversifolia*)**

Tithonia diversifolia is a medicinal plant that has pharmacological activity due to the presence of flavonoids and phenolics contained therein. Many strategies are used to increase the production of these metabolites. The addition of abiotic elicitors is the most effective strategy to increase metabolite compounds. The purpose of this study was to determine the effect of $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ elicitor on the growth and production of total phenolic and flavonoids in insulin plant callus cultures. Callus induced from leaf explants. The explants were inoculated on MS initiation medium supplemented with 4 ppm NAA, 1.5 ppm BAP. 0.1 g of callus was transferred to the treatment medium which was added with the elicitor $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (1, 3, 5 and 7 ppm). Callus were harvested after 15 days of subculture to observe color, texture, fresh weight, dry weight, and flavonoid and phenolic content. Flavonoid and phenolic contents were analyzed quantitatively using a UV-Vis spectrophotometer. The results showed that the callus produced was yellowish white, reddish yellow, greenish white, and brownish yellow with a crumb and compact texture. There was a significant difference in the fresh weight and dry weight of callus, where the highest average fresh weight and dry weight of callus were found in the 0 ppm treatment, namely 0.144397 grams and 0.0575 grams. The highest levels of flavonoids and phenolics were found in the 1 ppm treatment, namely 139,428 mg/L dan 77,687 mg/L.

Keywords: *Tithonia diversifolia*, flavonoids, fenolic, callus culture, copper sulfata

UIN SUNAN AMPEL
S U R A B A Y A

DAFTAR ISI

Halaman Persetujuan.....	i
Pengesahan Tim Penguji Skripsi.....	ii
Pernyataan Keaslian.....	iii
Lembar Pernyataan Persetujuan Publikasi Karya Ilmiah.....	iv
Motto.....	v
Halaman Persembahan.....	vi
Kata Pengantar.....	vii
Abstrak.....	viii
Abstract.....	ix
Daftar Isi.....	x
Daftar Tabel.....	xii
Daftar Gambar.....	xiii
Daftar Lampiran.....	xiv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	8
1.3 Tujuan Penelitian.....	9
1.4 Manfaat Penelitian.....	9
1.5 Batasan Penelitian.....	9
1.6 Hipotesis.....	10
BAB II KAJIAN PUSTAKA.....	11
2.1 Tanaman Insulin.....	11
2.2 Teknik Kultur <i>In Vitro</i>	14
2.3 Kultur Kalus.....	16
2.4 Metabolit Sekunder.....	18
2.4.1 Flavonoid.....	19
2.4.2 Fenolik.....	20
2.5 Elisitor.....	22
2.5.1 Elisitor Tembaga (Cu).....	23
2.5.2 Elisitor $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	24
BAB III METODE PENELITIAN.....	26
3.1 Rancangan Penelitian.....	26
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian.....	27
3.3 Variabel Penelitian.....	28
3.4 Alat dan Bahan.....	29
3.4.1 Alat.....	29
3.4.2 Bahan.....	29
3.5 Prosedur Penelitian.....	29
3.5.1 Persiapan.....	29
3.5.2 Induksi Pembentukan Kalus.....	32
3.5.3 Penanaman Kalus Pada Media Produksi.....	32
3.5.4 Pemeliharaan Selama Perlakuan.....	33
3.5.5 Pengamatan.....	33

3.5.6 Analisis Kandungan Flavonoid dan Fenolik	34
3.6 Analisis Data	37
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	39
4.1 Pengaruh Pemberian Variasi Elisitor CuSO ₄ .5H ₂ O Terhadap Pertumbuhan Kalus Tanaman Insulin (<i>Tithonia diversifolia</i>)	39
4.1.1 Warna Kalus	39
4.1.2 Tekstur Kalus	45
4.1.3 Berat Segar kalus	50
4.1.4 Berat Kering Kalus	57
4.2 Pengaruh Pemberian Variasi Elisitor CuSO ₄ .5H ₂ O Terhadap Produksi Flavonoid dan Fenolik Total	61
4.2.1 Flavonoid	61
4.2.2 Fenolik	69
BAB V PENUTUP	78
5.1 Kesimpulan	78
5.2 Saran	78
Daftar Pustaka	80
Lampiran	96



UIN SUNAN AMPEL
S U R A B A Y A

DAFTAR TABEL

Tabel 3.1 Rancangan Penelitian.....	27
Tabel 3.2 Jadwal Pelaksanaan Penelitian.....	28
Tabel 4.1 Hasil Warna Kalus Insulin yang Berusia 15 Hari.....	40
Tabel 4.2 Hasil Tekstur Kalus Insulin (<i>T. diversifolia</i>).....	46
Tabel 4.3 Hasil Berat Segar Kalus.....	50
Tabel 4.4 Hasil Uji <i>Mann-Whitney</i> Berat Segar Kalus.....	51
Tabel 4.5 Hasil Berat Kering Kalus.....	58
Tabel 4.6 Hasil Uji <i>Post Hoc</i> Berat Kering Kalus.....	59
Tabel 4.7 Kadar Konsentrasi Flavonoid Kultur Kalus Insulin.....	64
Tabel 4.8 Kadar Konsentrasi Fenolik Kultur Kalus Insulin.....	72



UIN SUNAN AMPEL
S U R A B A Y A

DAFTAR GAMBAR

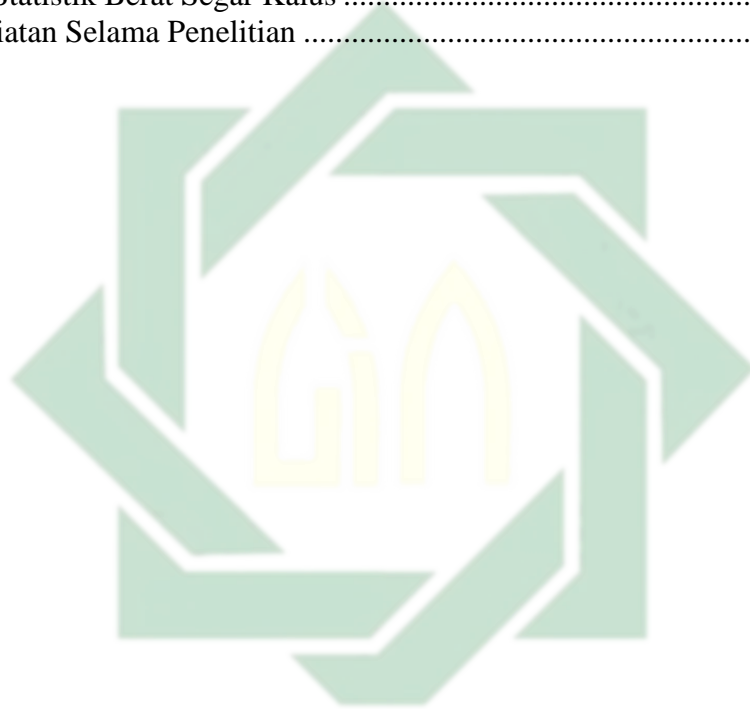
Gambar 2.1 Tanaman Insulin (<i>Tithonia diversifolia</i>)	13
Gambar 2.2 Kalus yang Terbentuk dari Eksplan Batang.....	17
Gambar 2.3 Struktur Kimia Flavonoid (C6-C3-C6)	20
Gambar 2.4 Struktur Senyawa Fenolik	22
Gambar 2.5. Kristal $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	25
Gambar 4.1 Warna Kalus Pada Media $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ Setelah 15 Hari.....	39
Gambar 4.2 Tekstur Kalus Pada Media $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ Setelah 15 Hari	49
Gambar 4.3 Grafik Rata-Rata Berat Segar Kalus	53
Gambar 4.4 Grafik Rata-Rata Berat Kering Kalus	60
Gambar 4.5 Kurva Larutan Standar Kuersetin Pada Panjang Gelombang 514 nm ...	63
Gambar 4.6 Kurva Larutan Standar Asam Galat Pada Panjang Gelombang 760 nm	71



UIN SUNAN AMPEL
S U R A B A Y A

DAFTAR LAMPIRAN

A. Penentuan Kadar Konsentrasi Flavonoid.....	96
B. Penentuan Kadar Konsentrasi Fenolik.....	98
C. Uji Statistik Berat Segar Kalus	100
D. Uji Statistik Berat Segar Kalus	103
E. Kegiatan Selama Penelitian	105



UIN SUNAN AMPEL
S U R A B A Y A

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan negara dengan keanekaragaman hayati yang melimpah sehingga disebut dengan negara *megabiodiversity* (Walujo, 2008; Rohman *et al.*, 2019). Keanekaragaman hayati yang tersebar di wilayah Indonesia terdapat kurang lebih 30.000 spesies tanaman (Amelia, 2018). Banyaknya spesies tanaman tersebut salah satunya tergolong dalam spesies tanaman obat. Tanaman obat merupakan sumber bahan yang kaya dan dapat digunakan dalam pengembangan dan sintesis obat untuk menyembuhkan berbagai penyakit (Hassan, 2012).

Salah satu tanaman obat Indonesia yang termasuk dalam family *Asteraceae* yang merupakan tanaman asli Meksiko dan tumbuh di Asia, Australia, beberapa bagian Afrika, dan Amerika yaitu tanaman insulin (*Tithonia diversifolia*) (Jama *et al.*, 2000; Pretti *et al.*, 2018). Masyarakat banyak menggunakan tanaman ini sebagai obat alternatif karena dapat menyembuhkan beberapa penyakit seperti diabetes, malaria, diare, sakit tenggorokan, nyeri haid, dan peradangan (Tona, *et al.*, 2000; Chunodom *et al.*, 2019; Afolaya *et al.*, 2020). *T. diversifolia* is know as insulin because it is widely used for diabetes (Pretti *et al.*, 2018). Bagian tanaman *T. diversifolia* yang digunakan sebagai obat tradisional yaitu pada bagian daun, atau bisa juga menggunakan bagian kulit akar, batang, buah, dan biji (Sasmita *et al.*, 2017; Lubis *et al.*, 2019). Beberapa penelitian menunjukkan bahwa *T. diversifolia* memiliki aktivitas farmakologis seperti antiinflamasi, antimalaria, analgesik,

antimalaria, antimikroba, dan antidiabetes (Paula *et al.*, 2012). Pemanfaatan tanaman sebagai obat juga telah dijelaskan dalam al-Qur'an yaitu surah an-Nur ayat 35:

اللَّهُ نُورُ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ مِثْلُ نُورِهِ كَمِشْكُوتٍ فِيهَا مِصْبَاحٌ الْمِصْبَاحُ فِي زُجَاجَةٍ
الزُّجَاجَةُ كَأَنَّهَا كَوْكَبٌ دُرِّيٌّ يُوقَدُ مِنْ شَجَرَةٍ مُبَارَكَةٍ زَيْتُونَةٍ لَا شَرْقِيَّةٍ وَلَا غَرْبِيَّةٍ يَكَادُ زَيْتُهَا
يُضِيءُ وَلَوْ لَمْ تَمْسَسْهُ نَارٌ نُورٌ عَلَى نُورٍ يَهْدِي اللَّهُ لِنُورِهِ مَنْ يَشَاءُ وَيَضْرِبُ اللَّهُ الْأَمْثَالَ
لِلنَّاسِ وَاللَّهُ بِكُلِّ شَيْءٍ عَلِيمٌ ۝

Artinya: "Allah (pemberi) cahaya (kepada) langit dan bumi. Perumpamaan cahaya-Nya, seperti sebuah lubang yang tidak tembus, yang di dalamnya ada pelita besar. Pelita itu di dalam tabung kaca (dan) tabung kaca itu bagaikan bintang yang berkilauan, yang dinyalakan dengan minyak dari pohon yang diberkahi, (yaitu) pohon zaitun yang tumbuh tidak di timur dan tidak pula di barat, yang minyaknya (saja) hampir-hampir menerangi, walaupun tidak disentuh api. Cahaya di atas cahaya (berlapis-lapis), Allah memberi petunjuk kepada cahaya-Nya bagi orang yang Dia kehendaki, dan Allah membuat perumpamaan-perumpamaan bagi manusia. Dan Allah Maha Mengetahui segala sesuatu." (Q.S an-Nur [24] : 35).

Menurut tafsir Ath-Thabari (1988) dalam kitab *Tafsir Jani' al-Bayan fi Tafsir al-Qur'an*, ayat ini menerangkan bahwa Allah sebagai pemberi petunjuk (*al-Hadi*) bagi penduduk langit dan bumi dengan cahayanya menuju kesabaran (*al-Haq*) dan memberikan tuntunan (*isyamat*) untuk keluar dari masalah yang kurang baik. Allah yang menuntun penduduk langit dan bumi dengan berbagai macam cara, berupa ilham, tuntunan secara langsung, sehingga orang keluar dari setiap masalah yang dihadapinya.

Berdasarkan ayat diatas, cahaya yang dikaruniai oleh Allah merupakan cahaya penyembuh terhadap segala permasalahan hidup baik lahir ataupun batin. Cahaya disini sama halnya seperti tanaman insulin (*T. diversifolia*) yang menjadi cahaya

(tanaman obat) yang dapat menyembuhkan permasalahan berdasarkan petunjuk yang diberikan oleh Allah dengan ditumbuhkannya tanaman insulin tersebut. Apabila Allah menghendaki seseorang mendapatkan cahaya (obat peyembuh) tersebut maka orang yang memanfaatkan tanaman insulin akan sembuh atas seizin Allah dan keluar dari masalah yang dihadapinya (sakit).

Pemanfaatan tanaman *T. diversifolia* sebagai tanaman obat dan efek yang dihasilkan berkaitan dengan kandungan senyawa kimia aktif yang terdapat dalam *T. diversifolia*. Senyawa aktif yang terdapat pada tanaman *T. diversifolia* yaitu seskuiterpenoid, diterpenoid, alkaloid, seskuiterpen, monoterperus, fenolik, dan flavonoid (Paula *et al.*, 2012; Odeyemi *et al.*, 2014). Flavonoid merupakan salah satu kelompok metabolit sekunder yang umumnya terdapat pada tanaman (Ladeska *et al.*, 2019). Flavonoid memiliki manfaat sebagai antibiotik, antibakteri, antiinflamasi, antioksidan, mencegah keropos tulang, melindungi struktur sel, dan meningkatkan efektifitas vitamin C (Yao, 2004; Haris, 2011; Ladeska *et al.*, 2019). Senyawa flavonoid pada tanaman terkandung pada bagian daun, akar, buah, dan kulit luar batang (Lumbessy *et al.*, 2013). Berdasarkan penelitian, daun insulin mengandung beberapa senyawa golongan flavonoid diantaranya yaitu flavonol, flavon, dan isoflavon (Panda & Luyten, 2018; Rahman *et al.*, 2021). Kelompok flavonol bermanfaat untuk mengurangi stres oksidatif yang disebabkan infeksi virus influenza pada paru-paru, dan sebagai pelindung dari radikal bebas (Kumar, 2003). Kelompok flavon memiliki fungsi fisiologis sebagai antioksidan, antiinflamasi, dan antianalgesik (Cotelle *et al.*, 1996; Al-Sanafi, 2014). Sedangkan

isoflavon berfungsi sebagai pelindung tanaman dari serangan penyakit (Robinson, 1995).

Selain flavonoid, senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada tanaman *T. diversifolia* yaitu fenolik. Fenolik memiliki manfaat sebagai antioksidan, mencegah beberapa gangguan penyakit seperti diabetes, kanker, arteriosklerosis, dan disfungsi otak (Dykes & Rooney, 2004; Gard *et al.*, 2016). Pada tanaman insulin, fenolik terkandung pada bagian akar, daun, batang, dan bunga (Yazid *et al.*, 2021; Kurniasari *et al.*, 2022). Golongan senyawa fenolik yang terkandung pada daun *T. diversifolia* yaitu fenol dan polifenol (Odeyemi *et al.*, 2014; Solfaine *et al.*, 2021). Kelompok fenol bermanfaat sebagai antioksidan dalam industri tekstil, industri karet, dan pewarna makanan (Puspha *et al.*, 1995; Tahir *et al.*, 2003). Kemudian kelompok polifenol bermanfaat sebagai antioksidan, dan berguna dalam pengawetan makanan (Galli, 2007).

Golongan senyawa metabolit sekunder tersebut bermanfaat dalam berbagai bidang industri, diantaranya yaitu bidang farmasi, pengolahan makanan, dan kosmetik (Senkal, 2020). Pada bidang farmasi senyawa metabolit sekunder dapat dimanfaatkan dalam pengobatan sarkoma payudara, ovarium, dan paru-paru (Mendoza & Eleazar, 2018). Kemudian dalam bidang pengolahan makanan, senyawa metabolit sekunder bermanfaat sebagai bahan pengawet makanan, pemberi rasa (manis, asam, pahit), serta pemberi warna pada makanan (Mazon *et al.*, 2019; Ku *et al.*, 2020). Selanjutnya dalam bidang kosmetik senyawa metabolit sekunder bermanfaat sebagai pemberi tekstur seperti pengental, dan pembentuk gel (Lopes *et al.*, 2020). Tanaman insulin (*T. diversifolia*) apabila dimanfaatkan dalam

berbagai bidang tersebut membutuhkan kestabilan dalam kualitas dan kuantitas senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan. Jika perbanyak tanaman insulin dilakukan secara konvensional maka kualitas maupun kuantitas senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan kurang optimal, sehingga dibutuhkan metode lain untuk mengoptimalkan kualitas metabolit sekunder tersebut seperti kultur jaringan tanaman. Kultur jaringan tanaman digunakan sebagai alat penting untuk produksi berkelanjutan senyawa aktif termasuk produksi metabolit sekunder (Leal *et al.*, 2018).

Kultur jaringan tanaman merupakan metode untuk melakukan perbanyak dan konservasi jenis tumbuhan (Oseni *et al.*, 2018). Penggunaan metode kultur dibandingkan dengan metode perbanyak tanaman lain lebih menguntungkan karena tanaman yang dihasilkan berkualitas unggul, diproduksi dalam skala besar dengan proses yang cepat, bibit tanaman yang dihasilkan memiliki karakteristik yang sama dengan tanaman induk, serta hasil tanaman kultur bebas dari penyakit dan hama (Drew, 1990; Sree, 2010). Terdapat beberapa teknik kultur jaringan tanaman yang digunakan untuk meningkatkan produksi metabolit sekunder suatu tanaman, diantaranya yaitu kultur kalus. Kultur kalus adalah salah satu teknik kultur jaringan yang secara efektif lebih cepat untuk memperoleh suatu metabolit sekunder (Effert, 2019). Keuntungan kultur kalus dalam produksi metabolit sekunder dibandingkan dengan tanaman utuh yaitu tidak memerlukan lahan yang luas, tidak adanya keterbatasan iklim, serta senyawa aktif yang diperoleh bersifat kontinu dalam keadaan terkontrol (Setiawati *et al.*, 2021). Keberhasilan menggunakan kultur kalus dalam produksi metabolit sekunder telah dibuktikan oleh

Benjamin *et al.* (2019); Khan *et al.* (2019) yang menghasilkan kadar metabolit sekunder lebih besar daripada kontrol yaitu 12,29 gGAE/mg pada kandungan fenolik, serta 1,73 gGE/mg kandungan flavonoid. Kemudian pada penelitian Gurav *et al.* (2019) juga disebutkan bahwa penggunaan kultur kalus mampu menghasilkan senyawa metabolit sekunder dalam jumlah yang besar yaitu polifenol sebanyak 53,6 mg/g dan kurkumin 36,1 mg/g. Namun, senyawa metabolit yang dihasilkan pada metode kultur kalus dirasa kurang optimal dalam kebutuhan skala industri. Oleh karena itu diperlukan strategi untuk meningkatkan produksi metabolit sekunder, salah satu upaya yang dapat digunakan untuk produksi metabolit sekunder dalam skala besar yaitu dengan menggunakan metode elisitasi (Halder *et al.*, 2019).

Elisitasi merupakan metode dalam teknik kultur jaringan untuk menciptakan kondisi stres (cekaman) melalui perubahan fisiologis ataupun metabolisme pada tanaman (Szczykutowicz, 2022). Penggunaan elisitasi pada kultur jaringan tanaman tersebut dapat mengaktifkan respon pertahanan tanaman sehingga meningkatkan sintesis metabolit sekunder dalam proporsi yang lebih besar (Hashim *et al.*, 2021). Senyawa yang digunakan dalam elisitasi untuk menginduksi metabolit sekunder disebut dengan elisitor, baik elisitor biotik yang berasal dari biologis maupun elisitor abiotik yang berasal dari non biologis (Radman *et al.*, 2003). Berdasarkan penelitian yang dilakukan Thakur *et al.* (2019) penambahan elisitor biotik maupun abiotik dapat mempengaruhi pertumbuhan dan produksi metabolit sekunder pada tanaman. Berdasarkan penelitian, penggunaan elisitor abiotik terbukti dapat meningkatkan senyawa metabolit sekunder sesuai dengan penelitian

yang dilakukan oleh Raei *et al.* (2014) yang menyatakan bahwa produksi metabolit sekunder aloin menghasilkan kadar yang tinggi yaitu sebesar 127% daripada perlakuan kontrol.

Salah satu elisitor abiotik yang dapat menginduksi produksi metabolit sekunder yaitu tembaga (Heinisch *et al.*, 2019). Tembaga (Cu) merupakan mikronutrient yang penting untuk perkembangan tanaman dan menjadi kofaktor enzim dalam berbagai proses fisiologis (Chung *et al.*, 2019). Penggunaan tembaga sebagai elisitor abiotik pada tanaman dengan konsentrasi rendah akan meningkatkan biosintesis senyawa tertentu yang berfungsi untuk pertahanan tanaman terhadap serangan patogen (Yang *et al.*, 2018; Angin, *et al.*, 2019). Sedangkan penggunaan elisitor tembaga dengan konsentrasi yang tinggi akan menyebabkan kondisi stres (cekaman) pada tanaman sehingga tanaman menghasilkan metabolit sekunder sebagai bentuk respon terhadap cekaman tersebut (Heinisch *et al.*, 2019). Tembaga (II) sulfat pentahidrat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) merupakan bentuk pentahidrat dari tembaga (II) sulfat (CuSO_4) yang menjadi sumber Cu utama karena efektivitas biaya dan ketersediaannya yang mudah (Shaonnn *et al.*, 2020). Tembaga (II) sulfat pentahidrat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) merupakan salah satu jenis elisitor abiotik yang dapat menginduksi stimulasi kandungan metabolit sekunder pada tanaman (Balazova *et al.*, 2008). Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Balazova *et al.* (2008) menunjukkan bahwa perlakuan dengan konsentrasi 25 mg/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ pada kultur suspensi sel bunga matahari (*Eschscholtzia californica* Cham.) dapat meningkatkan produksi metabolit sekunder sanguinarine selama 1-2 hari sebesar 10 kali lipat daripada perlakuan kontrol. Selain itu, banyak juga penelitian yang

menyebutkan tentang kemampuan penggunaan elisitor CuSO_4 dalam meningkatkan senyawa metabolit sekunder seperti katekin pada kalus teh (*Cammellia sinensis* L.) (Retnaningati *et al.*, 2019), asam fenolat pada kultur pucuk *Artemisia annua* (Darki *et al.*, 2019), bacoside dalam kultur pucuk *Bacopa monnieri* (Sharma *et al.*, 2015), serta stigmaserol dan sitosterol dalam kultur kalus purwoceng (*Pimpinella alpine* Molk.) (Sahin *et al.*, 2017).

Penggunaan elisitor CuSO_4 sejauh ini sudah pernah dilakukan pada beberapa penelitian untuk menginduksi kalus dan produksi metabolit sekunder seperti penggunaan CuSO_4 untuk menginduksi kalus dan produksi metabolit sekunder asam fenolat pada kultur kalus ganjo lalai (*Artemisia annua*) (Zarad *et al.*, 2021), serta CuSO_4 untuk menginduksi kalus dan produksi metabolit sekunder kardenolida pada kultur kalus *Turki digitalis* L. (Sahin *et al.*, 2017). Namun, penelitian mengenai elisitor $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ terhadap induksi kalus dan produksi metabolit sekunder flavonoid dan fenolik masih belum pernah dilakukan. Oleh karena itu, pada penelitian ini akan dilakukan pemberian variasi konsentrasi elisitor $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ untuk menginduksi kalus dan produksi metabolit sekunder flavonoid dan fenolik total pada tanaman insulin (*Tithonia diversifolia*).

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana pengaruh pemberian variasi elisitor $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ terhadap pertumbuhan kalus tanaman insulin (*Tithonia diversifolia*)?
2. Bagaimana pengaruh pemberian variasi elisitor $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ terhadap produksi flavonoid dan fenolik pada kultur kalus daun tanaman insulin (*Tithonia diversifolia*)?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Untuk mengetahui pengaruh pemberian variasi elisitor $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ terhadap pertumbuhan kalus tanaman insulin (*Tithonia diversifolia*).
2. Untuk mengetahui pengaruh pemberian variasi elisitor $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ terhadap produksi flavonoid dan fenolik pada kultur kalus daun tanaman insulin (*Tithonia diversifolia*).

1.4 Manfaat Penelitian

1. Bidang Pendidikan

Hasil penelitian ini diharapkan dapat dijadikan sebagai referensi tambahan dalam bidang ajar maupun referensi untuk penelitian-penelitian selanjutnya mengenai pengaruh konsentrasi $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ terhadap peningkatan flavonoid dan fenolik total pada kultur kalus daun tanaman insulin (*Tithonia diversifolia*).

2. Bidang Industri

Hasil penelitian ini diharapkan dapat meningkatkan jumlah metabolit sekunder dalam skala besar karena metabolit sekunder yang dihasilkan dari kultur tanaman dapat digunakan untuk mengatasi hama dan penyakit.

1.5 Batasan Penelitian

1. Elisitor yang digunakan dalam penelitian ini yaitu tembaga sulfat pentahidrat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$).
2. Eksplan yang digunakan untuk induksi kalus berasal dari daun tanaman insulin (*Tithonia diversifolia*).
3. ZPT yang digunakan untuk menginduksi kalus yaitu NAA 0,4 ppm + BAP 1,5 ppm.

4. Metabolit sekunder yang dianalisis pada penelitian ini yaitu total flavonoid dan fenolik.

1.6 Hipotesis

1. Terdapat pengaruh pemberian variasi elisitor $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ terhadap pertumbuhan kalus tanaman insulin (*Tithonia diversifolia*)
2. Terdapat pengaruh pemberian variasi elisitor $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ terhadap peningkatan flavonoid dan fenolik pada kultur kalus daun tanaman insulin (*Tithonia diversifolia*).



UIN SUNAN AMPEL
S U R A B A Y A

BAB II

KAJIAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Insulin

Tanaman insulin (*Tithonia diversifolia*) merupakan tanaman semak atau perdu yang tumbuh tersebar di Asia Tenggara dan memiliki bentuk bunga yang mirip dengan bunga matahari. Tanaman insulin disebut juga sebagai bunga matahari liar yang merupakan tanaman asli Amerika Tengah yang kemudian masuk ke negara tropika seperti India, Kenya, dan Indonesia (Sirait & Simanihuruk, 2021). Pada wilayah Indonesia, *T. diversifolia* banyak tumbuh di daerah Yogyakarta dan digunakan sebagai tanaman obat (Amanatie & Sulistyowati, 2015). Pada referensi Tjitrosoepomo (1988) tanaman insulin diklasifikasikan sebagai berikut:

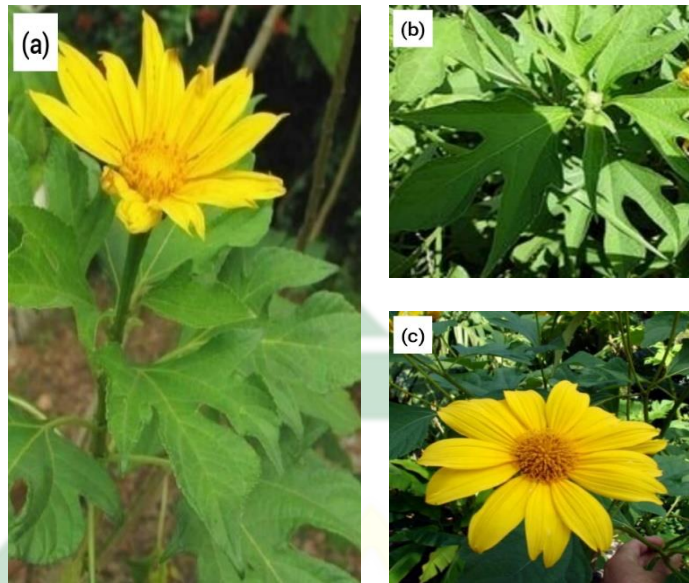
Kingdom : Plantae
Division : Mangnoliophyta
Class : Mangnoliopsida
Subclass : Asteridae
Order : Asterales
Family : Asteraceae/Compositae
Genus : *Tithonia*
Species : *Tithonia diversifolia*

Tanaman insulin (*T. diversifolia*) disebut juga sebagai paitan dan ada juga yang menyebutnya sebagai tanaman kembang bulan. Tanaman ini biasanya tumbuh di tempat terjal seperti tebing-tebing, pinggir sungai, dan selokan (Amanatie &

Sulistiyowati, 2015). Awalnya tanaman ini dipublikasikan sebagai tanaman hias tetapi banyak tumbuh berkembang di tempat-tempat liar seperti pada pagar tanaman, disekitar jalanan, dan ada pula yang tumbuh di gurun (Sirait & Simanihuruk, 2021). Pada ketinggian 5-1500 meter diatas permukaan laut tanaman insulin dapat tumbuh dengan mudah, selain itu tanaman insulin juga menggemari tempat-tempat yang cerah atau terkena matahari langsung sehingga dapat tumbuh dengan baik (Butar-Butar, 2019).

T. diversifolia memiliki ketinggian kurang lebih 2-3 meter dengan diameter batang antara 0,5-1,5 cm dan berongga. Batangnya berwarna hijau tegak, lembut, bulat dengan warna putih pada empulurnya dan termasuk batang tegak berkayu, tetapi batang akan berubah menjadi rebah dan merunduk (mencapai tanah) ketika tanaman ini sudah berbunga. Morfologi batang insulin tersebut dapat dilihat pada gambar 2.1 (a). Akar insulin termasuk akar tunggang yang dalam, dan bercabang (Lestari, 2016; Putri, 2018).

Tanaman insulin memiliki daun berwarna hijau, panjang daun kira-kira 26-32 cm dengan lebar daun 15-25 cm, pertulangan daun menyirip, pangkal dan ujung daunnya runcing, tepi daunnya bergerigi, serta termasuk jenis daun tunggal yang berseling (Gambar 2.1 b) (Lestari, 2016). *T. diversifolia* juga memiliki bunga yang tergolong bunga majemuk yang muncul diujung ranting, tangkainya bulat, berbentuk tabung pada kelopaknya, berbulu halus, putiknya melengkung, berwarna kuning, serta pada ketiak daun atau ujung percabangan muncul perbungaan (gambar 2.1 c) (Butar-Butar, 2019).



Gambar 2.1 (a) Tanaman Insulin (b) Daun tanaman insulin (c) Bunga tanaman insulin (*Tithonia diversifolia*).

Sumber: Amanatie & Sulistyowati, 2015; Widyanigrum, 2019.

T. diversifolia dikenal oleh masyarakat karena khasiatnya sebagai tanaman obat. Tanaman insulin bisa dimanfaatkan sebagai obat tradisional untuk menyembuhkan berbagai penyakit seperti sakit perut, kembung, diare, anti radang, antinflamasi, diabetes, malaria, dan penyakit infeksi lainnya (Dalimartha, 2000; Zirconia *et al.*, 2015; Sasmita *et al.*, 2017). Pada tanaman insulin (*T. diversifolia*) bagian yang sering digunakan sebagai sumber zat kimia terutama untuk pengobatan tradisional yaitu bagian daun, dan terkadang ada juga yang menggunakan bagian kulit akar dan batang (Verawati *et al.*, 2011). Penelitian lain juga menyebutkan bahwa bagian buah dan biji dari tanaman insulin bisa digunakan sebagai sumber zat kimia dalam pengobatan tradisional (Sasmita *et al.*, 2017).

Pemanfaatan daun tanaman insulin yang digunakan sebagai obat herbal dilakukan karena daun insulin mengandung senyawa kimia aktif atau senyawa

metabolit sekunder seperti flavonoid, alkaloid, terpenoid, saponin, tanin, serta polifenol (Amanatie & Sulistyowati, 2015). Kandungan senyawa aktif dalam daun insulin yaitu terpenoid dan flavonoid yang dapat mencegah pembentukan radikal bebas, dan menetralkan radikal bebas dengan metode enzimatik atau dengan cara meningkatkan aktivitas antioksidan endogen karena merupakan antioksidan (Indrasari, 2020).

2.2 Teknik Kultur *In Vitro*

Teknik perbanyakan tanaman secara vegetatif dengan cara mengisolasi bagian-bagian tanaman seperti mata tunas, daun, sel, protoplas serta menumbuhkan bagian-bagian tersebut dalam media buatan yang kaya akan nutrisi dan zat pengatur tumbuh disebut dengan kultur *in vitro* atau kultur jaringan tanaman (Ahloowalia *et al.*, 2004; Kurnianingsih *et al.*, 2020). Cara perbanyakan tanaman menggunakan metode ini lebih menguntungkan dibandingkan dengan metode lain karena tanaman utuh yang ditumbuhkan bisa berasal dari semua bagian tanaman, bibit yang dihasilkan dalam jumlah banyak, serta waktu yang diperlukan cukup singkat (Handayani *et al.*, 2017). Pelaksanaan kultur jaringan tanaman didasarkan pada sifat totipotensi sel yaitu ketika suatu sel tanaman diletakkan dalam lingkungan yang sesuai maka akan menjadi individu baru yang sempurna karena adanya kemampuan dalam sel tumbuhan tersebut (Samanhudi *et al.*, 2021).

Syarat yang harus terpenuhi dalam proses kultur jaringan yaitu membuat kondisi yang aseptis (steril) agar terhindar dari berbagai mikroorganisme dengan cara melakukan sterilisasi pada alat dan bahan yang digunakan (Kurnianingsih *et al.*, 2021). Selain itu, alat-alat yang digunakan dapat disemprotkan dengan

menggunakan senyawa kimia yang juga berpotensi membunuh dan menghambat pertumbuhan mikroorganisme seperti alkohol 70%, HgCl₂, CuSO₄, AgNO₃, dan beberapa larutan garam (Hafsan, 2014).

Kultur jaringan tanaman menggunakan media kultur sebagai peletakan eksplan. Eksplan sendiri merupakan bagian dari tanaman seperti tunas, batang, biji, dan akar yang digunakan sebagai bahan awal untuk proses kultur (Handayani *et al.*, 2017). Media yang biasa digunakan dalam proses kultur jaringan yaitu MS (*Murashige Skoog*) karena media tersebut mengandung ammonium, kalsium, nitrat, dan unsur makro maupun mikro sehingga berpengaruh baik terhadap pertumbuhan eksplan. Selain itu, kandungan sukrosa yang terdapat dalam media MS berfungsi sebagai proses induksi karena menjadi sumber karbon dan energi (Ratnasari *et al.*, 2016; Samanhudi *et al.*, 2021). Perbanyakkan tanaman dengan metode kultur jaringan dapat dikaitkan dengan penjelasan Allah tentang penciptakan tanaman dari sesuatu yang mati yaitu dalam al-Qur'an surah al-An'am ayat 95:

إِنَّ اللَّهَ فَالِقُ الْحَبِّ وَالنَّوَى يُخْرِجُ الْحَيَّ مِنَ الْمَيِّتِ وَمُخْرِجُ الْمَيِّتِ مِنَ الْحَيِّ ذَلِكُمُ اللَّهُ فَالِقُ تُوَفَّكُونَ

Artinya: "Sungguh, Allah yang menumbuhkan butir (padi-padian) dan biji (kurma). Dia mengeluarkan yang hidup dari yang mati dan mengeluarkan yang mati dari yang hidup. Itulah (kekuasaan) Allah, maka mengapa kamu masih berpaling?" (Q.S al-An'am [6]: 95).

Menurut tafsir Tahlili pada ayat ini Allah menjelaskan bahwa semua kehidupan terjadi karena adanya Pencipta kehidupan, yaitu Allah. Allah mengembang biakkan segala macam tumbuh-tumbuhan dari benih-benih kehidupan, baik yang berbentuk butiran-butiran ataupun biji-bijian. Uraian ilmiah tentang ayat ini adalah sebagai

berikut: mengeluarkan yang hidup dari yang mati dan mengeluarkan yang mati dari yang hidup, merupakan siklus kehidupan (*life cycle*) dari semua makhluk hidup atau living organisms (sering hanya ditulis organisms), utamanya dari jenis makhluk tingkat tinggi, seperti manusia, hewan ataupun tumbuhan. Jika berbicara tentang tanaman/tumbuhan, maka kalimat “*mengeluarkan yang hidup dari yang mati*”, mengisyaratkan bahwa tanaman (yang hidup itu) keluar dari biji-biji yang ditanam. Biji-biji ini dapat dianggap sesuatu yang mati. Sebab jika tidak menemukan kondisi yang sesuai, ia tetap merupakan benda mati. Sedangkan “*mengeluarkan yang mati dari yang hidup*”, mengisyaratkan bahwa biji-biji (yang mati itu) keluar atau dihasilkan oleh tanaman (yang hidup). Inilah yang merupakan kekuasaan atau ayat Allah.

Berdasarkan ayat diatas dijelaskan tentang penciptaan semua makhluk termasuk tanaman. Tanaman yang hidup keluar dari biji-bijian yang mati, dimana dalam hal kultur jaringan tanaman yang tumbuh dari hasil kultur berasal dari eksplan yang ditanam pada media dimana eksplan tadi dianggap telah mati karena sudah tidak ada sumber energi yang mengalir karena terpotong menjadi eksplan. Eksplan yang dianggap mati ini berasal dari tanaman insulin (yang hidup).

2.3 Kultur Kalus

Kultur yang diambil dari bagian eksplan yang sudah membentuk kalus disebut dengan kultur kalus, sedangkan kalus merupakan sekumpulan sel *amorfo* yang terbentuk dari sel-sel yang terus membelah secara *in vitro* di dalam tabung kultur (Saptiani *et al.*, 2021). Terbentuknya kalus pada eksplan merupakan akibat dari

pelukaan bagian tepi irisan eksplan karena kalus termasuk jaringan penutup luka yang bersifat meristematis sehingga terjadi respond tumbuhan (Arsyam *et al.*, 2020).



Gambar 2.2 Kalus yang Terbentuk dari Eksplan Batang
Sumber: Setiawati *et al.*, 2020.

Pertumbuhan kalus pada kultur jaringan selain dipengaruhi oleh media juga bisa dipengaruhi oleh pemberian ZPT (Zat Pengatur Tumbuh) baik auksin ataupun sitokinin yang merupakan suatu senyawa organik yang dapat menghambat, mendorong, serta mengubah pertumbuhan dan perkembangan tanaman dengan pemberian konsentrasi tidak terlalu tinggi yaitu <1 mm (Azizah, 2017). Zat pengatur tumbuh yang sering digunakan dengan tujuan merangsang pembentukan kalus dari golongan auksin yaitu NAA (*Naphthaleine Acetic Acid*) karena berfungsi untuk pembelahan sel, pemanjangan sel, pembesaran jaringan, dan pembentukan akar. Pemberian NAA akan merangsang pembentukan kalus dan menghambat perumbuhan akar dan batang pada konsentrasi tinggi (Rahman *et al.*, 2021). Selain itu Asam 2,4-Diklorofenoksiasetat (2,4-D) juga bisa digunakan karena memiliki aktivitas yang kuat untuk mempercepat proses diferensiasi sel, organogenesis, serta menjaga pertumbuhan kalus (Rivai & Helmanto, 2015). Auksin seringkali digabungkan dengan sitokinin seperti kinetin dan *Benzyl Amino Purin* (BAP) untuk

menginduksi kalus (Setiyawati *et al.*, 2019). Konsentrasi auksin dan sitokinin yang diberikan akan mendorong pertumbuhan kalus apabila jumlahnya seimbang (Ikeuchi *et al.*, 2013). Apabila konsentrasi auksin yang diberikan lebih besar daripada sitokinin maka akan terinduksi pertumbuhan akar, sebaliknya yaitu ketika konsentrasi sitokinin lebih besar daripada auksin maka yang akan terinduksi yaitu pertumbuhan tunas (Azizah, 2017).

Pada media kultur, pertumbuhan kalus ditentukan dengan mengukur berat kering dan basahnya (Handayani *et al.*, 2012). Pertumbuhan kalus tersebut nantinya bisa memberikan informasi antara hubungan pertumbuhan serta produksi metabolit sekundernya sehingga sangat berguna apabila melakukan penelitian mengenai analisis metabolit sekunder serta pemanenan jaringan pada waktu tertentu (Zakaria, 2010). Pertumbuhan kalus sendiri memiliki tiga tahap yaitu lag (adaptasi) pada tahap pertama dimana kalus masih mengalami adaptasi terhadap media baru sehingga tidak ada pertumbuhan, selanjutnya yaitu terjadi pertumbuhan secara maksimal yang disebut dengan tahap eksponensial, dan terakhir yaitu tahap stasioner dimana pertumbuhan kalus mulai menurun bahkan bisa menjadi linear (Sanchez *et al.*, 2000).

2.4 Metabolit Sekunder

Suatu senyawa yang diproduksi atau yang dihasilkan sebagai bentuk adaptasi biokimia yang dilakukan oleh golongan tumbuhan disebut dengan metabolit sekunder pada tanaman (Fajarullah *et al.*, 2014). Produksi senyawa metabolit sekunder pada tanaman tersebut terjadi karena tanaman sedang berada dalam kondisi cekaman. Keberadaan senyawa metabolit sekunder dalam tumbuhan

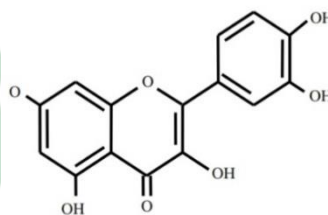
sebenarnya tidak terlalu penting terutama bagi pertumbuhan, atau reproduksi makhluk hidup. Tetapi, keberadaan senyawa ini dapat berguna sebagai pertahanan tanaman dari serangan hama karena senyawa ini bersifat toksik terutama pada hewan. Salah satu contoh senyawa metabolit sekunder tersebut yaitu fenol, alkaloid, saponin, terpenoid, dll. (Kusbiantoro & Purwaningrum, 2018). Pada daun tanaman insulin (*T. diversifolia*) jenis senyawa metabolit sekunder yang terkandungnya yaitu flavonoid dan fenolik (Ramadhani *et al.*, 2020).

2.4.1 Flavonoid

Flavonoid merupakan salah satu senyawa metabolit sekunder yang keberadaannya pada tumbuhan sangat penting (Alfaridz & Amalia, 2018). Pada tumbuhan, flavonoid berfungsi sebagai pemberi warna, pemberi warna pada biji; buah; dan bunga, serta pemberi warna (Mierziak *et al.*, 2014). Selain itu keberadaan flavonoid juga menjadi proteksi atau pelindung bagi tumbuhan dari pengaruh lingkungan, sebagai antimikroba, dan perlindungan dari sinar UV (Alfaridz & Amalia, 2018). Efek yang ditimbulkan dari senyawa flavonoid sebagai senyawa polifenol yaitu efek antioksidan, anti kanker, anti radang, anti bakteri, dan anti virus (Parubak, 2013). Golongan senyawa yang termasuk flavonoid yaitu flavonol, flavon, flavanol, flavanon, antosianidin, dan isoflavon (Diniyah & Lee, 2020).

Flavonoid berbiosintesis menggunakan jalur fenilpropanoid dan termasuk turunan dari *2-phenyl-benzyl- γ -pyrone* (Alfaridz & Amalia, 2018). Berat molekul flavonoid rendah yaitu berbasis inti 2-fenil-

kromon yang termasuk biosintetis dari turunan asam asetat atau fenilalanin dengan menggunakan jalur asam shikimat (Arifin & Ibrahim, 2018). Senyawa tersebut termasuk golongan polifenol dengan konfigurasi elektronnya yaitu C6-C3-C6 yang terdiri dari 15 atom, maknanya yaitu terdapat dua gugus C6 (cincin benzena tersubstitusi) oleh rantai alifatik tiga karbon pada kerangka karbonnya (Tiang-Yang *et al.*, 2018). Senyawa flavonoid juga larut dengan baik dalam pelaur polar seperti etanol, metanol, butanol, aseton, dimetilformamida dan sebagainya karena termasuk golongan senyawa polar (Arifin & Ibrahim, 2018).



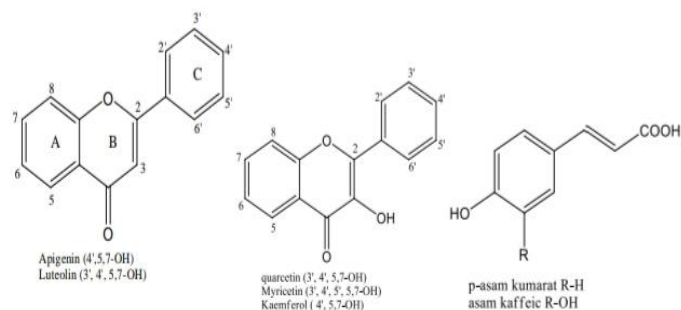
Gambar 2.3 Struktur Kimia Flavonoid (C6-C3-C6)
Sumber: Redha, 2020.

2.4.2 Fenolik

Senyawa metabolit sekunder yang juga terkandung dalam daun tanaman insulin yaitu fenolik yang banyak ditemukan pada tumbuhan ((Ramadhani *et al.*, 2020). Senyawa tersebut diproduksi oleh tumbuhan sebagai bentuk jawaban terhadap stres lingkungan (Hanin & Pratiwi, 2017). Fenolik termasuk kelompok senyawa terbesar yang berfungsi sebagai antioksidan karena memiliki kemampuan membentuk radikal

fenoksi yang stabil pada reaksi oksidasi, antioksidan tersebut nantinya dapat menangkal radikal bebas yang akan menuju pada terjadinya kerusakan oksidatif (Dhurhania & Novianto, 2018). Senyawa ini juga termasuk golongan senyawa polifenol yang berfungsi sebagai antidiabetes (Megawati *et al.*, 2021). Senyawa fenolik juga berfungsi sebagai proteksi dari lingkungan yaitu melindungi tanaman dari sinar UV-B, Kematian, serta melindungi DNA dari dimersiiasi dan kerusakan (Hanin & Pratiwi, 2017; Wardani *et al.*, 2020).

Senyawa fenolik merupakan metabolit sekunder bioaktif yang terdistribusi secara luas di tanaman khususnya yang disintesis oleh asam sikamat, pentosa fosfat, dan jalur fenilpropanoid (Randhir *et al.*, 2004; Balasundram *et al.*, 2006). Senyawa fenolik memiliki gugus hidroksi yang terikat pada cincin aromatis sebagai bentuk satu (fenol) atau lebih (polifenol) cincin fenol sehingga mudah teroksidasi dengan memberikan atom hidrogen pada radikal bebas. (Dhurhania & Novianto, 2018). Fenolik mempunyai bermacam-macam struktural mulai dari fenol sederhana sampai kompleks ataupun komponen yang terpolimerasi (Diniyah & Lee, 2020). Senyawa fenolik mempunyai cincin aromatik dengan satu atau lebih gugus hidroksi (H-) dan gugus-gugus lain penyertanya (Khadijah *et al.*, 2017).



Gambar 2.4 Struktur Senyawa Fenolik
Sumber: Megawati *et al.*, 2021.

2.5 Elisitor

Produksi metabolit sekunder pada suatu tanaman dapat dimanipulasi jumlahnya dengan menggunakan teknik *in vitro*. Banyak keuntungan yang diperoleh dengan menggunakan teknik ini dibandingkan dengan teknik konvensional diantaranya yaitu menghasilkan senyawa yang berkhasiat dalam kondisi yang terkontrol, kualitas dan kuantitas produk yang dihasilkan cukup konsisten, serta tidak adanya pengaruh kondisi lingkungan (geografis, iklim, musim) untuk dapat memproduksi. Apabila teknik *in vitro* yang digunakan tidak cukup dalam produksi metabolit dapat dilakukan manipulasi yaitu dengan memanipulasi faktor lingkungan dan media, pemilihan eksplan yang bernilai tinggi, pemberian prekursor, dan elisitasi (Mulabagal & Tsay, 2004).

Elisitasi merupakan satu diantara banyak cara yang cukup efektif untuk meningkatkan produksi senyawa metabolit. Elisitasi merupakan teknik yang sering digunakan dalam kultur jaringan dengan cara menambahkan senyawa yang disebut elisitor dengan tujuan untuk meningkatkan kandungan metabolit sekunder pada tumbuhan sehingga menciptakan kondisi stres (cekaman) melalui perubahan

fisiologis ataupun metabolisme pada tumbuhan (Utami *et al.*, 2020). Elisitor yang digunakan akan masuk ke dalam membran sel tanaman yang akan menjadi sinyal dalam sel tumbuhan melalui Ca^{2+} yang berperan sebagai *second messenger*. Proses yang terjadi tersebut akan memacu respon seluler pada sel terhadap rangsangan eksternal sehingga sel mengubah ekspresi gennya. Adanya Ca^{2+} dalam sitosol dapat mengaktifkan beberapa enzim termasuk protein kinase. Protein kinase tersebut yang nantinya akan memfosforilasi enzim yang mengatur metabolisme termasuk produksi metabolit sekunder (Sholikhah, 2014)

Elisitor yang digunakan dapat berupa elisitor biotik maupun abiotik. Elisitor biotik mempunyai sifat biologis yang berasal dari patogen tanaman sendiri, sedangkan elisitor abiotik tidak mempunyai sifat biologis yang dikategorikan sebagai faktor fisika dan senyawa kimia (Ningsih, 2014). Salah satu penggunaan elisitor biotik yaitu bisa berasal dari mikroba patogen, jamur, dan herbivora. Sedangkan elisitor abiotik bisa berasal dari senyawa anorganik, suhu, sinar UV, dan ion logam berat (Namdeo, 2007; Fitria *et al.*, 2018).

2.5.1 Elisitor Tembaga (Cu)

Tembaga (Cu) merupakan bagian dari kompleks fotosistem pada proses fotosintesis karena Cu merupakan salah satu mikronutrien yang memiliki fungsi esensial. Pada semua jenis tanaman baik yang tumbuh biasa ataupun mengalami kultur secara alami akan menyerap ion Cu^{2+} melalui bulu akar dan dibantu oleh mikroba pada proses penyerapannya. Jumlah unsur Cu^{2+} yang berlebihan pada tanaman akan menyebabkan terjadinya cekaman pada tanaman, oleh karena itu

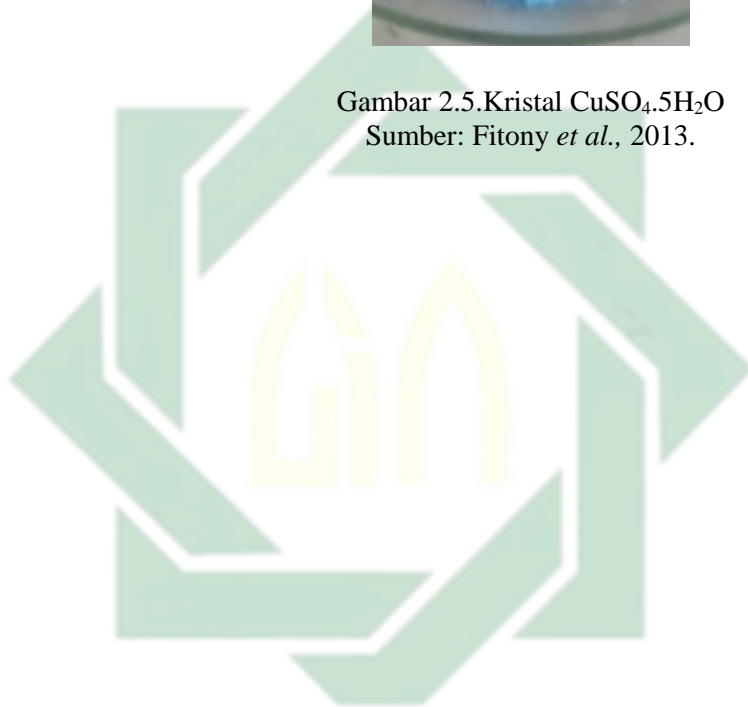
tumbuhan akan meyerap dan mengakumulasinya untuk mengurangi dampak cekaman tersebut (Nurchayati, 2017). Kondisi stress atau cekaman yang dialami oleh tumbuhan akibat ion Cu^{2+} yang berlebihan akan menyebabkan meningkatnya akumulasi metabolit sekunder (Abdillah *et al.*, 2015).

2.5.2 Elisitor $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

Senyawa kimia $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ merupakan salah satu jenis elisitor abiotik yang dapat menginduksi stimulasi kandungan metabolit sekunder pada tanaman (Balazova *et al.*, 2008). Senyawa kimia $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ atau yang biasa disebut tembaga (II) sulfat pentahidrat merupakan bentuk pentahidrat dari tembaga (II) sulfat (CuSO_4) yang berwarna biru (Putra, 2020). Senyawa $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ merupakan hasil olahan dari bentuk Cu bekas menjadi kristal biru yang diproduksi dari barang-barang yang mengandung tembaga seperti kabel dan kumparan sehingga menjadi bentuk tembaga baru dengan nilai yang tinggi. Selain itu, reaksi antara tembaga dengan asam sulfat dan juga asam nitrat apabila dipanaskan juga akan terbentuk kristal $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Fitony *et al.*, 2013).



Gambar 2.5. Kristal $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
Sumber: Fitony *et al.*, 2013.



UIN SUNAN AMPEL
S U R A B A Y A

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) untuk mengetahui pengaruh elisitor CuSO_4 terhadap pertumbuhan kalus dan produksi metabolit sekunder (flavonoid dan fenolik) dengan lima macam konsentrasi yaitu 0 ppm, 1 ppm, 3 ppm, 5 ppm, dan 7 ppm. Setiap konsentrasi yang ada dilakukan pengulangan sebanyak 5 kali yang ditentukan berdasarkan rumus Federer yaitu $(n-1)(t-1) \geq 15$ (Wahyuningrum dan Probosari, 2012).

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

$$(n-1)(5-1) \geq 15$$

$$(n-1)(4) \geq 15$$

$$n-1 \geq 3,75$$

$$n \geq 4,37$$

Setiap pengulangan terdiri dari 3 eksplan daun *T. diversifolia*, sehingga total percobaan atau total eksplan yaitu sebanyak 15.

Rancangan penelitian dapat dilihat pada tabel 3.1 berikut:

Tabel 3.1 Rancangan Penelitian

Ulangan	Perlakuan				
	A	B	C	D	E
1	A1	B1	C1	D1	E1
2	A2	B2	C2	D2	E2
3	A3	B3	C3	D3	E3
4	A4	B4	C4	D4	E4
5	A5	B5	C5	D5	E5

Keterangan:

A: 0 ppm $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (kontrol)

B: 1 ppm $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

C: 3 ppm $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

D: 5 ppm $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

E: 7 ppm $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan pada bulan April-Desember 2022 sebagaimana disebutkan pada tabel 3.2 Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Integrasi Universitas Islam Negeri Sunan Ampel Surabaya mulai dari persiapan sampai pengamatan. Adapun jadwal pelaksanaan penelitian dapat dilihat pada tabel 3.2 dibawah ini:

Tabel 3.2 Jadwal Pelaksanaan Penelitian

No	Kegiatan	Bulan							
		1	2	3	4	5	6	7	8
1.	Persiapan	■							
2.	Pembuatan proposal skripsi		■	■	■	■			
3.	Seminar proposal			■	■	■			
4.	Persiapan alat dan bahan				■	■	■		
5.	Induksi pembentukan kalus				■	■	■	■	
6.	Produksi kalus					■	■	■	
7.	Pengamatan						■	■	
8.	Analisis data							■	■
9.	Pembuatan draft skripsi								■
10.	Sidang skripsi								■

3.3 Variabel Penelitian

a. Variabel Bebas (Independen)

Variabel bebas pada penelitian ini yaitu variasi konsentrasi elisitor $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ yang ditambahkan kedalam media kultur kalus tanaman insulin (*T. diversifolia*).

b. Variabel Terikat (Dependen)

Variabel terikat pada penelitian ini yaitu pertumbuhan kalus, dan kadar metabolit sekunder (flavonoid dan fenolik) yang dihasilkan pada setiap konsentrasi pemberian elisitor $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ kedalam kultur kalus tanaman insulin (*T. diversifolia*).

c. Variabel Kontrol

Variabel kontrol pada penelitian ini yaitu suhu, pH, dan intensitas cahaya pada saat proses inkubasi didalam ruang kultur.

3.4 Alat dan Bahan

3.4.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu autoklaf, gelas beker, botol kultur, gelas ukur, erlenmeyer, pipet volume, pipet tetes, spatula, pH meter, *hot plate*, aluminium foil, kertas label, plastik *wrap*, bunsen, pinset, cawan petri, scalpel, kertas saring, mortal dan alu, tabung reaksi, vortek, pinset, dan spektrofotometer UV-VIS.

3.4.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu daun muda tanaman insulin (*T. diversifolia*), elisitor $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, alkohol 70%, aquades steril, bayclin, media MS (*Murashige Skoog*), bahan pematat (agar), HCL 1 N, KOH 1 N, aquades, ZPT NAA (*Naphthaleine Acetic Acid*), BAP (*Benzyl Amino Purine*), sukrosa, metanol, n-heksana, etil asetat, kuersetin, NaNO_2 5%, AlCl_3 10%, asam galat, folin ciocalteu, dan Na_2CO_3 7%.

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Persiapan

a. Sterilisasi Alat

Alat-alat yang akan digunakan dicuci menggunakan sabun, lalu dibilas menggunakan air mengalir dan dikeringkan. Setelah kering alat-alat yang berbentuk botol atau memiliki mulut ditutup menggunakan aluminium foil,

sedangkan alat-alat lainnya (pinset, spatula, cawan petri, pipet, dan skalpel) dibungkus menggunakan kertas lalu semuanya dimasukkan dalam plastik tahan panas untuk selanjutnya di sterilisasi. Proses sterilisasi dilakukan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C pada tekanan 1,5 atm selama 30 menit.

b. Pembuatan Media

1. Media Inisiasi

Sukrosa sebanyak 30 g/L, MS, dan ZPT (NAA 4 ppm + BAP 1,5 ppm) dimasukkan kedalam erlenmeyer dengan ditambahkan aquades samapai volume 500 ml lalu dihimogenkan. Kemudian diukur pH larutan menggunakan pH meter dengan kisaran medium 5,5-5,8. Apabila pH larutan terlalu tinggi maka ditambahkan HCl 1N setetes demi setetes untuk menurunkan pH, sedangkan jika pH larutan terlalu rendah maka ditambahkan KOH 1N setetes demi setetes untuk menaikkan pH. Setelah itu, agar sebanyak 7 gr dimasukkan kedalam larutan tersebut lalu dipanaskan hingga mendidih. Selanjutnya media yang sudah dipanaskan dimasukkan kedalam botol kultur sebanyak 20 ml kemudian ditutup dengan aluminium foil dan plastik wrap, serta diberi label. Terakhir yaitu botol yang berisi media disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1,5 atm selama 15 menit.

2. Media Produksi

Sukrosa 30 g/L, MS, ZPT (NAA 4 ppm + BAP 1,5 ppm), dan elisitor $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dengan konsentrasi 0 ppm, 1 ppm, 3 ppm, 5 ppm, dan 7 ppm dimasukkan kedalam erlenmeyer dengan ditambahkan aquades samapai volume 250 ml pada setiap perlakuan lalu dihomogenkan. Kemudian diukur pH larutan menggunakan pH meter dengan kisaran medium 5,5-5,8. Apabila pH larutan terlalu tinggi maka ditambahkan HCl 1N setetes demi setetes untuk menurunkan pH, sedangkan jika pH larutan terlalu rendah maka ditambahkan KOH 1N setetes demi setetes untuk menaikkan pH. Setelah itu, agar sebanyak 7 gr dimasukkan kedalam larutan tersebut lalu dipanaskan hingga mendidih. Selanjutnya media yang sudah dipanaskan dimasukkan kedalam botol kultur sebanyak 20 ml kemudian ditutup dengan aluminium foil dan plastik wrap, serta diberi label. Terakhir yaitu botol yang berisi media disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1,5 atm selama 15 menit.

c. Persiapan Bahan Tanaman

Tanaman *T. diversifolia* diidentifikasi berdasarkan ciri morfologinya dengan jurnal “Leaflet Tanaman Pestisida *Tithonia diversifolia* (Hemsley) A. Gray” (Ajarwala *et al*, 2013). Kemudian tanaman diaklimatisasi supaya dapat beradaptasi dengan kondisi lingkungan yang baru (Suryani & Sari, 2018).

3.5.2 Induksi Pembentukan Kalus

a. Sterilisasi eksplan

Daun *T. diversifolia* dicuci menggunakan air mengalir dan dibuang bagian yang tidak layak pakai semisal daun berwarna kuning. Setelah itu daun direndam didalam larutan klorok 10 ml dan aquades 90 ml selama 15 menit pada erlenmeyer. Kemudian daun direndam lagi menggunakan aquades steril sebanyak tiga kali dengan lama masa perendaman berturut-turut 5 menit, 3 menit, dan 1 menit. Perendaman eksplan tersebut dilakukan didalam *laminar air flow*.

b. Penanaman eksplan

Eksplan daun *T. diversifolia* diletakkan pada cawan petri kemudian dipotong dengan ukuran 1x1 cm. Potongan tersebut ditanam pada media inisiasi melawati bunsen dan dikerjakan didalam *laminar air flow*. Botol kultur yang berisi eksplan diturup dengan aluminium foil dan plastik wrap.

c. Tahap pemeliharaan

Eksplan yang sudah ditanam kemudian di inkubasi dalam ruang kultur steril pada suhu 24-25°C dengan pencahayaan 24 jam terang untuk menghasilkan kalus. Botol-botol kemudian disemprot alkohol 70% untuk mencegah terjadinya kontaminasi (Fitri *et al.*, 2012).

3.5.3 Penanaman Kalus Pada Media Produksi

Kalus yang diperoleh dari media inisiasi yaitu kalus yang berumur 28 hari lalu dipindahkan pada media perlakuan yaitu media MS padat dengan berbagai konsentrasi yaitu 0 ppm, 1 ppm, 3 ppm, 5 ppm, dan 7 ppm.

Pemindahan kalus dilakukan dalam *laminar air flow* secara aseptis menggunakan pinset steril. Selanjutnya botol kultur ditutup dengan aluminium foil dan plastik wrap lalu diinkubasi dalam ruang kultur steril.

3.5.4 Pemeliharaan Selama Perlakuan

Kalus pada media perlakuan diinkubasi dalam ruang steril pada suhu 24-25°C selama 15 hari. Botol-botol kemudian disemprot alkohol 70% untuk mencegah terjadinya kontaminasi.

3.5.5 Pengamatan

a. Morfologi Kalus

Morfologi kalus diamati pada akhir penelitian yang meliputi warna dan tekstur kalus. Warna kalus ditentukan sesuai dengan kriteria warna kalus yang ada yaitu hijau, putih kehijauan, putih kekuningan, kuning kecoklatan, coklat kehitaman, dan sebagainya. Sedangkan tekstur kalus ditentukan sesuai dengan kriteria macam tekstur kalus yang ada yaitu kalus tekstur remah, kalus tekstur intermediet, dan kalus tekstur kompak.

b. Penentuan Berat Segar dan Berat Kering kalus

Penentuan berat segar kalus dilakukan dengan cara menimbang kalus yang telah tumbuh pada media perlakuan setelah dilakukan subkultur dan massa inkubasi selama 15 hari. Sedangkan berat kering kalus ditentukan dengan mengeringkan kalus menggunakan oven selama 24 jam pada suhu 50°C.

3.5.6 Analisis Kandungan Flavonoid dan Fenolik Kalus

a. Ekstraksi

Kalus tanaman insulin pada semua perlakuan dikeringkan dengan menggunakan oven selama 24 jam pada suhu 50°C. Setelah kering, kalus dihaluskan menggunakan mortar dan alu hingga menjadi serbuk. Serbuk sebanyak 0,05 gram direndam selama 24 jam pada 5 ml metanol, proses ekstraksi tersebut menggunakan metode maserasi. Agar senyawa dapat larut sempurna maka proses tersebut harus dilakukan 2x. Setelah itu ekstrak disaring dan dipartisi dengan perbandingan 1:1 menggunakan n-heksana. Kemudian hasilnya terbentuk 2 lapisan, dimana lapisan atas berupa fraksi n-heksana diambil dan disimpan ditempat yang bersih, sedangkan lapisan bawah yaitu fraksi metanol dipartisi dengan perbandingan 1:1 menggunakan etil asetat untuk megekstrak senyawa flavonoid dan fenolik. Kemudian ekstrak metanol etil asetat diambil untuk dianalisis kadar flavonoid.

b. Pembuatan Larutan Standar Kuersetin

Larutan standar atau larutan induk dibuat dengan menimbang 0,01 g kuersetin kemudian dilarutkan dalam 100 ml metanol p.a sehingga dihasilkan larutan kuersetin 100 ppm. Kemudian dilakukan pengenceran berseri dengan konsentrasi 10, 20, 30, 40, dan 50 ppm dengan cara mengambil 1; 2; 3; 4; dan 5 ml pada larutan induk dan ditambah metanol p.a sampai volume 10 ml. Setelah itu, masing-masing konsentrasi ditambahkan 75 µL larutan NaNO₂ 5% ditunggu selama 6 menit,

Kemudian ditambahkan 150 μL AlCl_3 10% secara perlahan dan ditunggu 5 menit, selanjutnya ditambahkan 0,5 ml NaOH 1 N, terakhir ditambah aquades hingga mencapai volume 2,5 ml. Selanjutnya larutan dianalisis menggunakan spektrofotometer UV-VIS dengan panjang gelombang 514 nm. Larutan blanko yang digunakan yaitu metanol.

c. Pembuatan Kurva Baku Kuersetin

Kurva baku kuersetin dibuat dengan cara menghubungkan konsentrasi larutan standar dengan nilai absorbansi yang didapatkan dari pengukuran spektrofotometer UV-VIS. Selanjutnya nilai yang diperoleh dimasukkan sehingga terbentuk persamaan $y = bx + a$, dimana x adalah konsentrasi, y adalah absorbansi, a adalah intersept (perpotongan dengan garis sumbu y), dan b adalah slope (kemiringan garis regresi). Kelinearan kurva dihitung dengan koefisien korelasi (r).

d. Penetapan Kadar Flavonoid Ekstrak

Sebanyak 5 ml ekstrak metanol etil asetat kalus pada semua perlakuan dipekatkan pada suhu ruang hingga menempel pada dinding botol. Kemudian ditambahkan 0,125 ml metanol, 0,625 ml aquades, dan 37,5 μL larutan NaNO_2 5% didiamkan selama 6 menit, Kemudian ditambahkan 75 μL AlCl_3 10% secara perlahan dan ditunggu 5 menit, Selanjutnya ditambahkan 0,25 ml NaOH 1 N, dan aquades hingga volume 2,5 ml. Selanjutnya larutan dianalisis menggunakan spektrofotometer UV-VIS dengan panjang gelombang 514 nm dengan menggunakan larutan blanko metanol. Setelah itu, hasil yang didapatkan dimasukkan kedalam kurva

standar kuersetin. Konsentrasi flavonoid dalam sampel dihitung melalui plot kalibrasi, sedangkan kadar flavonoid dihitung menggunakan rumus berikut:

$$\text{Kadar flavonoid total} = \frac{\text{Konsentrasi } \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}}\right) \times \text{Volume sampel (L)}}{\text{Berat sampel (g)}}$$

e. Pembuatan Larutan Standar Asam Galat

Larutan standar atau larutan induk dibuat dengan menimbang 0,01 g asam galat kemudian dilarutkan dalam 100 ml metanol p.a sehingga dihasilkan larutan kuersetin 100 ppm. Kemudian dilakukan pengenceran berseri dengan konsentrasi 10, 20, 30, 40, dan 50 ppm dengan cara mengambil 1; 2; 3; 4; dan 5 ml pada larutan induk dan ditambah metanol p.a sampai volume 10 ml. Kemudian dari masing-masing konsentrasi diambil 1 ml dan ditambahkan pereaksi folin ciocalteu 0,5 ml didiamkan selama 8 menit sambil dikocok, lalu ditambahkan Na_2CO_3 7% sebanyak 4 ml dan divortex selama 1 menit. Selanjutnya larutan dianalisis menggunakan spektrofotometer UV-VIS dengan panjang gelombang 760 nm. Larutan blanko yang digunakan yaitu metanol.

f. Pembuatan Kurva Baku Asam Galat

Kurva baku asam galat dibuat dengan cara menghubungkan konsentrasi larutan standar dengan nilai absorbansi yang didapatkan dari pengukuran spektrofotometer UV-VIS. Selanjutnya nilai yang diperoleh dimasukkan sehingga terbentuk persamaan $y = bx + a$, dimana x adalah konsentrasi, y adalah absorbansi, a adalah intersept (perpotongan dengan garis sumbu y),

dan b adalah slope (kemiringan garis regresi). Kelinearan kurva dihitung dengan koefisien korelasi (r).

g. Penetapan Kadar Fenolik Ekstrak

Ekstrak etil asetat kalus sebanyak 1 ml pada semua perlakuan dipekatkan pada suhu ruang hingga menempel pada dinding botol. Kemudian ditambahkan pereaksi folin ciocalteu 0,5 ml didiamkan selama 8 menit sambil dikocok, lalu ditambahkan Na_2CO_3 7% sebanyak 4 ml dan divortex selama 1 menit. Selanjutnya larutan dianalisis menggunakan spektrofotometer UV-VIS dengan panjang gelombang 760 nm. Larutan blanko yang digunakan yaitu metanol. Setelah itu, hasil yang didapatkan dimasukkan kedalam kurva standar asam galat. Konsentrasi fenolik dalam sampel dihitung melalui plot kalibrasi, sedangkan kadar fenolik dihitung menggunakan rumus berikut:

$$\text{Kadar fenolik total} = \frac{\text{Konsentrasi } \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}}\right) \times \text{Volume sampel (L)}}{\text{Berat sampel (g)}}$$

3.6 Analisis Data

Data yang didapatkan adalah data kuantitatif dan kualitatif. Data kualitatif yaitu pengamatan morfologi kalus berupa warna dan tekstur kalus yang disajikan secara deskriptif. Sedangkan data kuantitatif yaitu perhitungan berat basah, berat kering, dan kadar metabolit (flavonoid dan fenolik). Data kuantitatif tersebut dianalisis secara statistik menggunakan uji ANOVA (*Analysis of Variance*) ketika data terdistribusi normal. Apabila hasilnya nanti terdapat perbedaan (H_0 ditolak) maka dilanjutkan dengan uji *Post Hoc* Test untuk mengetahui perbedaan yang signifikan

antar kelompok perlakuan. Sebaliknya, apabila data tidak terdistribusi normal, maka menggunakan uji non parametrik *Kruskal Wallis*. Apabila hasilnya nanti terdapat perbedaan (H_0 ditolak) maka dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney* untuk mengetahui perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan.



UIN SUNAN AMPEL
S U R A B A Y A

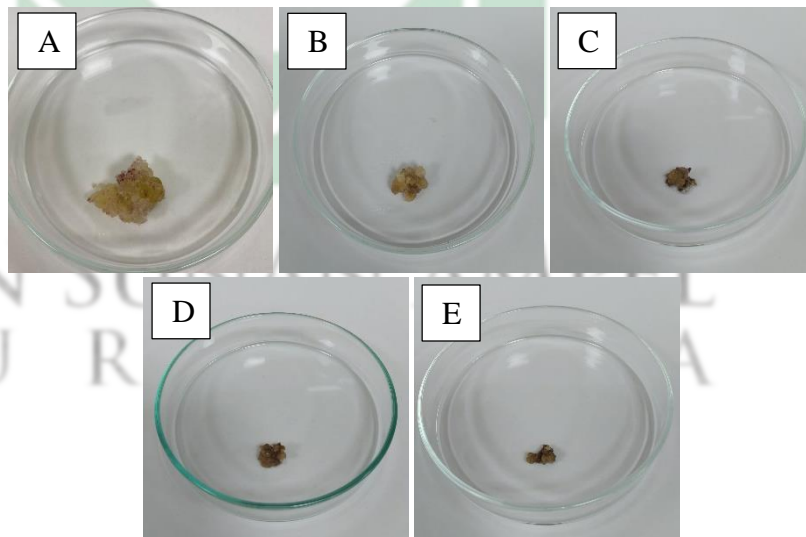
BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pengaruh Pemberian Variasi Elisitor $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ Terhadap Pertumbuhan Kalus Tanaman Insulin (*Tithonia diversifolia*)

4.1.1 Warna Kalus

Pada beberapa perlakuan pemberian variasi elisitor $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ menunjukkan adanya reaksi yang beragam terhadap kalus tanaman insulin (*Tithonia diversifolia*). Reaksi yang beragam tersebut dapat dilihat dari warna kalus setelah disubkultur dan diinkubasi selama 15 hari pada gambar 4.1 berikut.



Gambar 4.2 Warna Kalus Pada Media $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ Setelah 15 Hari Subkultur. (A) Kontrol, (B) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1 ppm, (C) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 3 ppm, (D) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 5 ppm, (E) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 7 ppm (Sumber Pribadi, 2023)

Variasi warna kalus yang dihasilkan dari berbagai konsentrasi elisitor dapat dilihat pada tabel 4.1 dibawah ini:

Tabel 4.1 Hasil Warna Kalus Insulin yang Berusia 15 Hari

Perlakuan	Ulangan	Kalus	Warna Kalus
0 ppm	A	A1	Putih Kehijauan
		A2	Putih Kehijauan
	B	B1	Hijau Kemerahan
		B2	Hijau Kemerahan
	C	C1	Hijau Kemerahan
		C2	Hijau Kemerahan
	D	D1	Putih Kehijauan
		D2	Putih Kehijauan
	E	E1	Hijau Kemerahan
		E2	Hijau Kemerahan
1 ppm	A	A1	Putih Kekuningan
		A2	Putih Kekuningan
	B	B1	Kuning Kecoklatan
		B2	Kuning Kecoklatan
	C	C1	Kuning Kecoklatan
		C2	Kuning Kecoklatan
	D	D1	Putih Kekuningan
		D2	Putih Kekuningan
	E	E1	Kuning Kecoklatan
		E2	Kuning Kecoklatan
3 ppm	A	A1	Kuning Kecoklatan
		A2	Kuning Kecoklatan
	B	B1	Kuning Kecoklatan
		B2	Kuning Kecoklatan

5 ppm	A	A1	Kuning Kecoklatan
		A2	Kuning Kecoklatan
	B	B1	Kuning Kecoklatan
		B2	Kuning Kecoklatan
	C	C1	Kuning Kecoklatan
		C2	Kuning Kecoklatan
	D	D1	Putih Kekuningan
		D2	Putih Kekuningan
	E	E1	Kuning Kecoklatan
		E2	Kuning Kecoklatan
7 ppm	A	A1	Kuning Kecoklatan
		A2	Kuning Kecoklatan
	B	B1	Kuning Kecoklatan
		B2	Kuning Kecoklatan
	C	C1	Kuning Kecoklatan
		C2	Kuning Kecoklatan
	D	D1	Kuning Kecoklatan
		D2	Kuning Kecoklatan
	E	E1	Kuning Kecoklatan
		E2	Kuning Kecoklatan

Pada kultur jaringan tanaman bentuk respon organogenesis terindikasi dengan adanya perubahan warna pada kalus. Pelukaan yang terjadi mengakibatkan adanya proliferasi pada kalus dan akan membentuk jaringan parenkim yang bersifat meristematik dan berdiferensiasi ke bentuk yang lebih spesifik ketika kalus berproliferasi secara terus-menerus (Fatmawati *et al.*, 2010). Berdasarkan gambar 4.1 dan tabel 4.1 diatas

terlihat bahwa warna kalus yang dihasilkan dengan pemberian variasi elisitor $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ terdapat perbedaan.

Perbedaan warna kalus yang terjadi pada setiap perlakuan dapat terjadi karena pada setiap kalus mengalami perbedaan perkembangan. Selain itu, adanya pigmentasi; intensitas cahaya; dan sumber eksplan juga berpengaruh terhadap warna kalus (Laila & Savitri, 2014). Pigmentasi pada permukaan kalus dapat terjadi merata secara keseluruhan ataupun hanya sebagian, hal ini dapat dilihat pada warna dari satu kalus yaitu putih, hijau, coklat, putih kehijauan, putih kecoklatan (Mardini, 2015).

Warna kalus pada media kontrol atau tanpa penambahan $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ berwarna hijau keputihan dengan sedikit warna ungu pada ujung kalus setelah 15 hari inkubasi. Kalus yang berwarna putih merupakan jaringan embrionik yang belum mengandung kloroplas, tetapi mempunyai kandungan butir pati yang merupakan polisakarida simpanan pada tumbuhan (Junairiah *et al.*, 2018). Selain itu, warna kalus yang putih atau terang dapat menunjukkan bahwa kalus dalam kondisi baik (Andaryani, 2010).

Kalus yang berwarna hijau menunjukkan adanya klorofil dalam jaringan, semakin banyak kandungan klorofil pada kalus, maka warna kalus semakin hijau (Fatmawati *et al.*, 2010). Selain itu, Peningkatan sitokinin yang tinggi juga menyebabkan kalus berwarna hijau. Sitokinin yang ditambahkan dalam media mampu menghambat perombakan butir-

butir klorofil karena sitokinin dapat mengaktifkan proses metabolisme dan sintesis protein (Andaryani, 2010).

Pengamatan warna kalus hari ke-15 pada media $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dengan konsentrasi 1 ppm berwarna putih kekuningan, kemudian pada media $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dengan konsentrasi 3 ppm berwarna putih kecoklatan, kemudian pada media $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dengan konsentrasi 5 ppm berwarna putih kecoklatan, dan pada media $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dengan konsentrasi 7 ppm berwarna kuning kecoklatan.

Berdasarkan uraian diatas dapat disimpulkan bahwa pemberian $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dengan variasi konsentrasi dapat berpengaruh terhadap warna kalus yaitu semakin tinggi konsentrasi $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ maka warna kalus akan semakin pekat atau kecoklatan. Hal ini sesuai dengan penelitian Jannah (2016) yang menghasilkan warna kalus yang semakin pekat dari konsentrasi terendah sampai konsentrasi tertinggi Cu^{2+} yaitu hijau kekuningan, hijau kecolatan, dan coklat.

Perubahan warna yang terjadi tersebut disebabkan karena adanya substitusi antara $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dengan media. Komposisi media juga termasuk faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim yang mempengaruhi pertumbuhan (Ulva *et al.*, 2019). Tembaga (Cu) merupakan mikronutrien yang keberadaannya berperan penting bagi tanaman karena dapat berfungsi sebagai penyusun enzim, pembentukan klorofil, serta berperan dalam pembentukan metabolisme karbohidrat dan protein dalam proses pertumbuhan tanaman (Supriyantini *et al.*, 2018).

Pemberian $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ diduga dapat menyebabkan kalus mengalami perubahan warna karena adanya cekaman. Cekaman yang diberikan oleh media terhadap kalus menyebabkan kalus akan berubah warna menjadi lebih tua daripada kalus segar. Ketika warna kalus pada suatu media menjadi lebih tua, menandakan bahwa terjadi aktifitas biosintesis metabolit sekunder lebih tinggi dan lebih besar (Syabana *et al.*, 2017). Pencoklatan pada kalus tersebut disebut dengan istilah *browning*. *Browning* merupakan perubahan warna yang terjadi pada eksplan menjadi warna coklat (kecoklatan) dan merupakan tanda terjadinya kemunduran fisiologis eksplan (Madmudah, 2017). Pencoklatan pada kalus juga mengindikasikan penurunan pertumbuhan pada sel-sel kalus, dimana sel-sel tersebut mempunyai aktivitas pembelahan yang rendah sehingga daya regenerasinya berkurang (Ulva *et al.*, 2019).

Penyebab *browning* pada kalus biasanya terjadi karena adanya metabolisme senyawa fenol yang bersifat berlebih yang sering terangsang akibat proses sterilisasi eksplan (Indah & Ermavitalini, 2013). Intensitas warna coklat berhubungan positif dengan hiperaktivitas enzim oksidatif, sedangkan peningkatan aktivitas enzim tersebut berkaitan dengan reaksi pertahanan jaringan dari stress oksidatif (Laila & Savitri, 2014). Oleh karena hal tersebut, maka dapat diasumsikan bahwa pencoklatan yang terjadi pada kalus ini disebabkan stres yang dialami oleh kalus karena adanya cekaman elisitor $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Hal ini sebanding dengan penelitian Ariningsih (2003) yang menghasilkan warna kalus cenderung coklat

bahkan kehitaman pada perlakuan dengan penambahan ion Cu^{2+} . Adanya akumulasi fenol yang cukup besar pada kalus akibat absorpsi Cu menyebabkan kondisi kalus tersebut menjadi coklat. Hal ini berhubungan dengan peran Cu sebagai kofaktor untuk enzim polifenol oksidase yang memicu perubahan fenol menjadi kuinon (Prawiranta *et al.*, 1995; Ariningsih *et al.*, 2003).

Proses pencoklatan pada kalus tersebut masih termasuk peristiwa alamiah atau perubahan adaptif bagian tanaman akibat adanya pengupasan dan pemotongan (Indah & Ermavitalini, 2013). Walaupun kalus mengalami perubahan warna menjadi kecoklatan tetapi sel-sel kalus tidak mengalami kematian, hal ini dibuktikan dengan bertambahnya ukuran volume sel kalus.

4.1.2 Tekstur Kalus

Indikator lain untuk mengamati pertumbuhan kalus selain dari warna dapat juga diamati dari tekstur kalusnya. Kualitas kalus dapat ditentukan dengan melihat salah satu tandanya yaitu berdasarkan tipe atau tekstur kalus yang dihasilkan. Tekstur kalus dapat dibedakan atas kalus yang bertekstur remah (*friable*), kalus yang bertekstur kompak (*non friable*), dan kalus intermediet atau perpaduan kalus remah dan kompak (Maulidia & Fanata, 2019). Berdasarkan hasil penelitian didapat tekstur kalus yang disajikan pada tabel 4.2 dibawah ini.

Tabel 4.2 Hasil Tekstur Kalus Insulin

Konsentrasi CuSO ₄ .5H ₂ O	Tekstur Kalus	
	Awal	Akhir
A	Kompak	Remah
B	Kompak	Kompak
C	Kompak	Kompak
D	Kompak	Kompak
E	Kompak	Kompak

Keterangan: A= 0 ppm CuSO₄.5H₂O, B= 1 ppm CuSO₄.5H₂O, C= 3 ppm CuSO₄.5H₂O, D= 5 ppm CuSO₄.5H₂O, E= 7 ppm CuSO₄.5H₂O

Berdasarkan tabel 4.2 diatas diketahui bahwa terdapat perbedaan tekstur kalus pada perlakuan kontrol dan perlakuan elisitor. Pada perlakuan kontrol tekstur kalus yang dihasilkan setelah 15 hari subkultur yaitu menghasilkan kalus dari tekstur kompak menjadi kalus tekstur remah. Kalus remah merupakan kalus yang tersusun atas sel-sel tubular dimana susunan sel-selnya renggang, tidak teratur, dan mudah rapuh. Perubahan tekstur kalus tersebut diduga disebabkan karena susunan media. Media pada perlakuan kontrol mengandung zat pengatur tumbuhauksin (NAA) dan sitokinin (BAP) serta tidak ada penambahan elisitor didalamnya.

Zat pengatur tumbuh auksin yang berupa NAA dapat merangsang terbentuknya kalus menjadi remah. Anjani *et al.* (2022) melaporkan bahwa ZPT NAA akan menstimulasi pemanjangan sel dengan cara penambahan plastisitas dinding sel menjadi longgar, sehingga air dapat masuk kedalam dinding sel dengan cara osmosis dan sel mengalami pemanjangan, oleh karenanya tekstur kalus menjadi remah.

Keberadaan sitokinin (BAP) dalam media kultur juga berpengaruh terhadap tekstur kalus. Syahid *et al.* (2010) menyatakan bahwa adanya sitokinin dapat memacu pembelahan sel dalam proses sitokinensis pada saat sintesis RNA, dan protein yang akan memacu aktivitas auksin dalam pembelahan sel membentuk kalus. Hal tersebut sebanding dengan penelitian yang dilakukan oleh Tia *et al.* (2019) yang menghasilkan kalus tanaman krisan (*Chrysanthemum morifolium*) bertekstur remah dengan penggunaan zat pengatur tumbuh NAA dan BAP.

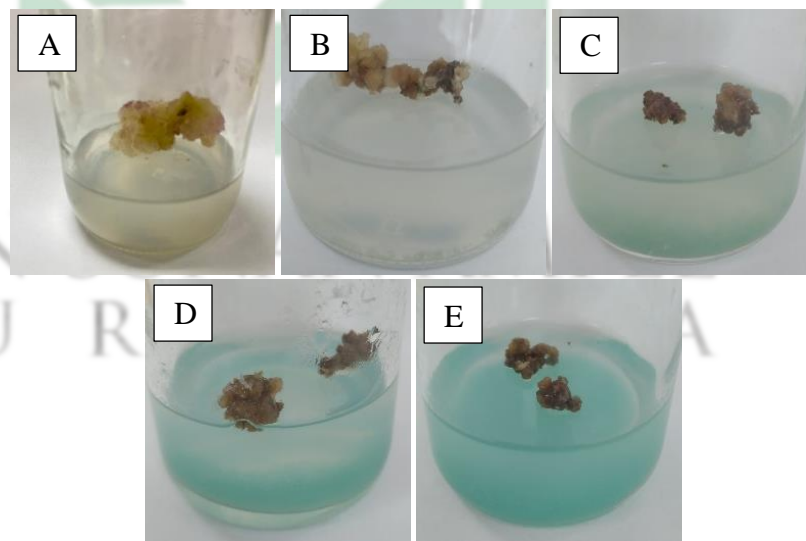
Selain karena adanya aktivitas zat pengatur tumbuh, perubahan tekstur kalus tersebut juga disebabkan karena dilakukan subkultur atau pemindahan kalus pada media baru. Pada penelitian ini, kalus perlakuan kontrol disubkultur dengan media yang sama pada saat inisiasi. Mahadi *et al.* (2016) menyebutkan bahwa subkultur yang dilakukan secara berulang dapat menghasilkan kalus dengan tekstur remah.

Kalus yang remah juga belum mengalami lignifikasi sehingga banyak mengandung air, serta antara kumpulan sel yang satu dengan yang lain relatif mudah untuk dipisahkan. Satria *et al.* (2019) menyatakan bahwa kalus remah merupakan kalus yang dikategorikan baik karena memudahkan dalam pemisahan menjadi sel-sel tunggal, dan akan meningkatkan aerasi oksigen antar sel. Adanya struktur tersebut dapat menjadi cara untuk perbanyak jumlah kalus melalui suspensi yang lebih mudah.

Tekstur kalus pada perlakuan elisitor baik pada konsentrasi 1 ppm, 3 ppm, 5 ppm, dan 7 ppm sama-sama bertekstur kalus kompak setelah 15 hari subkultur (gambar 4.2 A-E). Kalus kompak merupakan kalus yang memiliki struktur sel yang rapat, padat, dan sulit untuk dipisah-pisahkan. Tekstur kalus kompak juga memiliki vakuola yang besar dalam sel-selnya, serta memiliki dinding polisakarida yang lebih besar (Satria *et al.*, 2019). Ariati *et al.* (2012) menyatakan bahwa kalus yang bertekstur kompak memiliki ukuran sel yang kecil dengan sitoplasma yang padat, inti sel besar, dan memiliki banyak pati gandum (karbohidrat).

Tekstur kalus kompak yang terbentuk pada perlakuan elisitor baik pada konsentrasi 1 ppm, 3 ppm, 5 ppm, dan 7 ppm diduga disebabkan karena adanya zat pengatur tumbuh. Efek sitokinin dan auksin pada kalus akan mempengaruhi potensial air didalam sel sehingga tekstur kalus menjadi kompak (Jannah *et al.*, 2016). Purwaningsih *et al.* (2007) menyatakan bahwa kalus yang bertekstur kompak disebabkan karena adanya transport sitokinin yang membawa air dan zat hara dari bagian basal ke apeks melalui pembuluh pengangkut dan mempengaruhi potensi osmotik dalam sel. Kemudian akan terjadi tekana turgor akibat penambahan gula dalam media yang akan mengalir melalui pembuluh floem. Tekanan tersebut disebabkan oleh adanya perbedaan konsentrasi larutan, sehingga air dan zat hara tersebut akan masuk kedalam sel melalui cara osmosis. Hal tersebut yang menyebabkan kalus menjadi kompak karena dinding-dinding sel semakin kaku.

Kekompakan tekstur kalus juga diduga karena pemberian elisitor $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ pada media. Fitriani *et al.* (2012) melaporkan bahwa kalus yang bertekstur kompak disebabkan karena terjadinya peristiwa lignifikasi. Lignifikasi merupakan proses penguatan dinding sel pada tumbuhan yang disebabkan karena penumpukan lignin. Peristiwa lignifikasi tersebut dimulai ketika tumbuhan mulai mengalami penuaan dan didukung karena kandungan unsur tembaga. Cu merupakan mikronutrient yang dibutuhkan oleh tanaman karena mempunyai transporter khusus sehingga mudah diserap oleh tanaman. Penyerapan tersebut dilakukan secara simplas dan apoplas sehingga banyak akumulasi Cu pada jaringan pengangkut yang kemudian menyebabkan terjadinya lignifikasi (Mubarokah, 2015).



Gambar 4.2 Tekstur Kalus Pada Media $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ Setelah 15 Hari Subkultur. (A) Kontrol, (B) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1 ppm, (C) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 3 ppm, (D) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 5 ppm, (E) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 7 ppm (Sumber Pribadi, 2023)

4.1.3 Berat Segar Kalus

Salah satu parameter yang digunakan untuk mengetahui adanya pertumbuhan massa sel melalui proses pembelahan dan pembesaran sel yaitu dengan mengetahui berat segar kalus (Asmono & Sari, 2016). Kalus tanaman insulin yang diperoleh dari tahap inisiasi disubkultur pada media perlakuan elisitor dengan berat yang sama pada setiap konsentrasi yaitu 0,1 gram menggunakan neraca digital. Hal ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui perubahan volume sel pada setiap perlakuan dengan pemberian elisitor $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

Berat segar kalus tanaman insulin tersebut diperoleh dengan menimbang kalus yang telah tumbuh pada media perlakuan setelah dilakukan subkultur dan masa inkubasi selama 15 hari. Data hasil rata-rata berat segar kalus dapat dilihat pada tabel 4.3 dibawah ini:

Tabel 4.3 Hasil Berat Segar Kalus

Perlakuan	Rata-Rata \pm Standar Deviasi (g)	Nilai Uji <i>Kruskal Wallis</i>
A	1,4439 \pm 0,4093	
B	0,3191 \pm 0,2171	
C	0,1893 \pm 0,0638	0,000 < 0,05
D	0,1867 \pm 0,0484	
E	0,1428 \pm 0,0163	

Keterangan: A= 0 ppm $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, B= 1 ppm $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, C= 3 ppm $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, D= 5 ppm $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, E= 7 ppm $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

Berdasarkan tabel 4.3 diatas diketahui bahwa rata-rata berat segar kalus insulin mengalami penurunan mulai dari konsentrasi terendah hingga konsentrasi tertinggi, walaupun demikian nilai berat segar yang diperoleh

pada semua perlakuan bertambah dari inokulum awal yaitu 0,1 gram. Pada perlakuan 0 ppm didapatkan berat segar sebesar 1,4439 gram, perlakuan 1 ppm sebesar 0,3191 gram, perlakuan 3 ppm sebesar 0,1893 gram, perlakuan 5 ppm sebesar 0,1867 gram, dan perlakuan 7 ppm sebesar 0,1428 gram.

Data berat segar kalus tanaman insulin kemudian diuji secara statistik dan diperoleh hasil melalui uji normalitas bahwa data berat segar kalus tidak terdistribusi normal karena nilai signifikansi yang diperoleh kurang dari alfa yaitu ($0,00 < 0,05$). Karena data tersebut tidak terdistribusi normal maka dilanjutkan pada uji non parametrik yaitu uji *Kruskall Wallis* dan diperoleh nilai *Asymp. Sig* sebesar 0,00 yang berarti terdapat perbedaan berat segar kalus tanaman insulin karena nilai *p value* yang diperoleh kurang dari alfa ($0,00 < 0,05$), sehingga dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney* untuk mengetahui perbedaan berat segar kalus yang signifikan. Hasil uji *Mann-Whitney* dapat dilihat pada tabel 4.4 dibawah ini:

Tabel 4.4 Hasil Uji *Mann-Whitney* Berat Segar Kalus

Perlakuan	A	B	C	D	E
A		0,000*	0,000*	0,000*	0,000*
B			0,226	0,131	0,023*
C				0,821	0,070
D					0,151
E					

Keterangan: A= 0 ppm $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, B= 1 ppm $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, C= 3 ppm $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, D= 5 ppm $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, E= 7 ppm $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$,
 *=Perbedaan signifikan antar kelompok berat segar kalus

Berdasarkan tabel 4.4 diatas diketahui bahwa kelompok yang mengalami perbedaan yang signifikan yaitu kelompok kontrol dengan 1

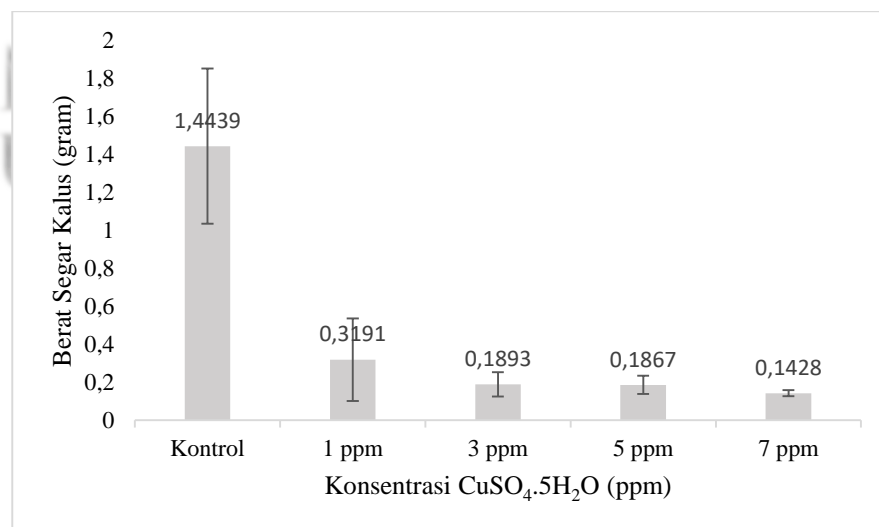
ppm, kontrol dengan 3 ppm, kontrol dengan 5 ppm, dan kontrol dengan 7 ppm dengan nilai *Asym. Sig* pada semua kelompok kurang dari alpha yaitu ($0,000 < 0,05$). Tidak hanya itu saja, pada perlakuan 1 ppm juga mengalami perbedaan yang signifikan dengan perlakuan 7 ppm dengan nilai *Asym. Sig* kurang dari alpha yaitu ($0,023 < 0,05$). Perbedaan signifikan yang terjadi tersebut diduga terjadi karena antar kelompok kontrol dengan kelompok lainnya terdapat perbedaan dalam susunan medianya, dimana pada kontrol tidak ada penambahan elisitor $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, sedangkan pada perlakuan lainnya terdapat penambahan elisitor dengan konsentrasi yang berbeda-beda.

Pada proses subkultur kalus, kelompok kontrol masih berada pada media yang sama seperti saat inisiasi, sedangkan pada kelompok lainnya berada pada media yang susunanya berbeda sehingga kalus masih berada dalam proses adaptasi media baru. Sutini *et al.* (2008) menyatakan bahwa ketika kalus beradaptasi dengan media baru maka pertumbuhan kalus tersebut akan menurun, dan pada saat itu sedang berlangsung fase lag menuju fase linier pertumbuhan sel, dimana pada fase ini pertumbuhan kalus mengalami perlambatan karena pembentukan metabolit sekunder mulai terjadi.

Selain itu, pada perlakuan 1 ppm dan 7 ppm juga mengalami perbedaan yang signifikan juga. Hal tersebut diduga karena perbedaan konsentrasi elisitor $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ yang ditambahkan pada media subkultur. Mahmudah

(2018) menyatakan bahwa akibat adanya perbedaan susunan media dan tingkatan konsentrasi yang diberikan berpengaruh terhadap pertumbuhan kalus. Surya (2015) dalam Mahmudah (2018) menambahkan bahwa konsentrasi yang diberikan pada media akan menentukan efektifitas komponen media pada tanaman, dimana akan menimbulkan aktivitas yang berbeda karena konsentrasi yang berbeda tersebut.

Susunan media yang paling optimal dalam menghasilkan berat segar kalus tanaman insulin tertinggi yaitu pada perlakuan kontrol (0 ppm) tanpa penambahan elisitor $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ yang dapat dilihat pada gambar 4.3. Hasil tersebut sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Sutini *et al.* (2008) yang menghasilkan berat segar kalus *Cammelia sinensis* tertinggi pada pemberian elisitor Cu^{2+} konsentrasi 0 ppm yaitu 0,512 gram dibandingkan konsentrasi tinggi lainnya.



Gambar 4.3 Grafik Rata-Rata Berat Segar Kalus (Sumber Pribadi, 2023)

Berdasarkan gambar 4.3 diatas diketahui bahwa rata-rata berat segar kalus tertinggi terjadi pada perlakuan kontrol (0 ppm) tanpa penambahan elisitor $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ yaitu 1,44397 gram, sedangkan rata-rata berat segar kalus terendah terjadi pada perlakuan dengan konsentrasi $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ tertinggi (7 ppm) yaitu 0,14282 gram. Hasil rata-rata yang diperoleh tersebut menunjukkan bahwa ada tidaknya elisitor $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dalam media kultur berpengaruh terhadap pertumbuhan kalus.

Pada perlakuan kontrol, medianya tersusun atas zat pengatur tumbuh NAA 4 ppm + BAP 1,5 ppm sama seperti media perlakuan lainnya, hanya saja tanpa ada penambahan elisitor $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Adanya zat pengatur tumbuh tersebut diduga menjadi penyebab bertambahnya berat kalus insulin. Azmi & Handrianti (2018) menyatakan bahwa pemberian zat pengatur tumbuh auksin (NAA) dan sitokinin (BAP) pada perbandingan yang tepat dapat menginisiasi pembelahan sel dan meningkatkan pertumbuhan serta pembesaran sel. Auksin dapat berpengaruh terhadap pertumbuhan kalus karena dapat menginduksi sekresi ion H^+ keluar melalui dinding sel, dinding sel selanjutnya mengalami pengasaman dan menyebabkan K^+ diambil sehingga mengurangi potensial air dalam sel yang menyebabkan air mudah masuk ke dalam sel sehingga sel membesar (Maftuchah & Joko, 1998). Sedangkan sitokini berperan dalam pembelahan dan sintesis protein, dimana sitokinin menyebabkan sel

berpoliferasi yang mengakibatkan kalus mengalami penambahan berat (Wattimena, 1991).

Pada perlakuan dengan konsentrasi $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ tertinggi (7 ppm) menghasilkan rata-rata berat segar kalus terendah diduga disebabkan karena kalus berada dalam fase pembentukan metabolit sekunder. Sutini *et al.* (2008) menyatakan bahwa lambatnya pertumbuhan kalus disebabkan karena masih berada di fase lag menuju fase linier pertumbuhan sel, dimana pada fase ini pembentukan metabolit sekunder pada kalus.

Tidak hanya pada konsentrasi 7 ppm saja berat segar kalus lebih kecil daripada kontrol, tetapi pada perlakuan 1 ppm, 3 ppm, dan 5 ppm berat segar kalus mengalami penurunan dengan rata-rata berat segar kalus berurutan yaitu 0,31911 gram, 0,18939 gram, dan 0,18679 gram. Hasil rata-rata berat segar kalus tersebut menunjukkan bahwa semakin meningkatnya konsentrasi $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ yang ditambahkan pada media, maka semakin menurun pula berat segar kalus. Penelitian serupa juga terjadi pada penelitian Zarad *et al.* (2021) dimana pada konsentrasi CuSO_4 dari terendah sampai tertinggi mengalami penurunan yaitu konsentrasi 2 mg/l (1,29 gram), 5 mg/l (1,16 gram), dan konsentrasi 10 mg/l (1,07 gram).

Menurunnya berat segar kalus pada setiap konsentrasi diduga disebabkan karena pemberian $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ yang melebihi batas normal. George & Klerk (2008) dalam penelitiannya menyebutkan bahwa konsentrasi tembaga yang tinggi dapat menjadi racun bagi sel tanaman.

Supriyantini *et al.* (2018) menambahkan bahwa semakin tinggi konsentrasi tembaga yang diberikan pada suatu media, maka pertumbuhan sel akan semakin rendah.

Selain hal tersebut diatas, berat segar kalus juga dipengaruhi oleh tekstur kalus. Pada penelitian ini kalus pada perlakuan kontrol bertekstur remah, sedangkan perlakuan lainnya dengan penambahan elisitor bertekstur kompak. Tekstur kalus remah memiliki kandungan air yang cukup tinggi, dan mengalami pembelahan sel yang lebih cepat daripada kalus bertekstur kompak, hal itu terjadi karena kalus kompak mengalami lignifikasi sehingga bertekstur keras (Silvina *et al.*, 2021). Pembelahan sel yang terjadi tersebut berhubungan dengan pertumbuhan kalus yaitu semakin cepat pembelahan sel maka pembesaran kalus juga akan meningkat (Jannah *et al.*, 2021).

Walaupun pada kelompok dengan penambahan elisitor $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ berat segar kalus lebih rendah daripada kelompok kontrol, tetapi berat segar kalus insulin tersebut bertambah sejak awal subkultur yaitu dengan berat 0,1 gram, terbukti pada perlakuan 1, 3, 5, dan 7 ppm rata-rata nilai berat segar kslus tersebut melebihi 0,1 gram. Oleh karena itu, dapat dikatakan bahwa adanya elisitor $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ juga berpengaruh terhadap meningkatnya berat segar kalus dari awal subkultur. Peristiwa ini setara dengan penelitian yang dilakukan oleh Sutini *et al.* (2008) dimana berat segar kalus *Camellia sinensis* mengalami penambahan sejak awal

subkultur sebanyak 0,5 gram menjadi 0,503 gram pada konsentrasi Cu 1 ppm, 0,501 gram pada konsentrasi 5 ppm, dan 0,506 gram pada konsentrasi 10 ppm.

Bertambahnya berat segar kalus tersebut membuktikan bahwa pemberian elisitor tembaga (Cu) pada medium perlakuan menunjukkan adanya pembelahan sel. Hal ini berkaitan dengan peran Cu sebagai katalis dalam tubuh tumbuhan, penyusun enzim (polifenol, oksidase, dan asam aksorbat oksidase), serta penyusun plastosianin yang merupakan bagian terpenting dalam sistem transpor elektron pada fotosintesis, sehingga proses fotosintesis meningkat diikuti dengan meningkatnya pembelahan sel (Jannah *et al.*, 22016).

4.1.4 Berat Kering Kalus

Pertumbuhan kalus selain dipengaruhi oleh berat segar kalus juga dipengaruhi oleh berat kering kalus. Berat kering kalus diperoleh dengan cara menimbang kalus yang telah dikeringkan menggunakan oven selama 24 jam pada suhu 50°C hingga tidak ada kandungan air didalamnya. Kalus dikeringkan dengan tujuan agar aktivitas metabolisme yang ada didalam sampel terhenti. Berat kering kalus ini, berbeda dengan berat segar kalus yang masih dipengaruhi oleh aktivitas metabolisme yang menyebabkan kesulitan dalam pengukuran berat yang konstan (Sitompul & Guritno, 1995; 2021). Data hasil rata-rata berat kering kalus dapat dilihat pada tabel 4.5 dibawah ini.

Tabel 4.5 Hasil Berat Kering Kalus

Perlakuan	Rata-Rata ± Standar Deviasi (g)	Nilai Uji Anova
A	0,0574 ± 0,0148	0,001 < 0,05
B	0,0215 ± 0,0122	
C	0,0204 ± 0,0076	
D	0,0203 ± 0,0052	
E	0,0181 ± 0,0021	

Keterangan: A= 0 ppm CuSO₄.5H₂O, B= 1 ppm CuSO₄.5H₂O, C= 3 ppm CuSO₄.5H₂O, D= 5 ppm CuSO₄.5H₂O, E= 7 ppm CuSO₄.5H₂O

Berdasarkan tabel 4.5 diatas diketahui bahwa rata-rata berat kering kalus insulin pada perlakuan 0 ppm didapatkan berat kering sebesar 0,0574 gram, perlakuan 1 ppm sebesar 0,0215 gram, perlakuan 3 ppm sebesar 0,0204 gram, perlakuan 5 ppm sebesar 0,0203 gram, dan perlakuan 7 ppm sebesar 0,181 gram.

Data berat kering kalus tanaman insulin kemudian diuji secara statistik dan diperoleh hasil melalui uji normalitas bahwa data berat kering kalus terdistribusi normal karena nilai signifikansi yang diperoleh dari semua perlakuan melebihi dari nilai alpha (0,05), sehingga dilanjutkan pada uji Anova. Berdasarkan uji Anova nilai sig yang diperoleh kurang dari alpha yaitu (0,001 < 0,05), artinya terdapat perbedaan rata-rata berat kering kalus antar kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan lainnya. Oleh karena itu harus dilanjutkan pada uji *Post Hoc* untuk mengetahui kelompok mana saja yang mengalami perbedaan yang signifikan. Hasil uji *Post Hoc* dapat dilihat pada tabel 4.6 dibawah ini:

Tabel 4.6 Hasil Uji *Post Hoc* Berat Kering Kalus

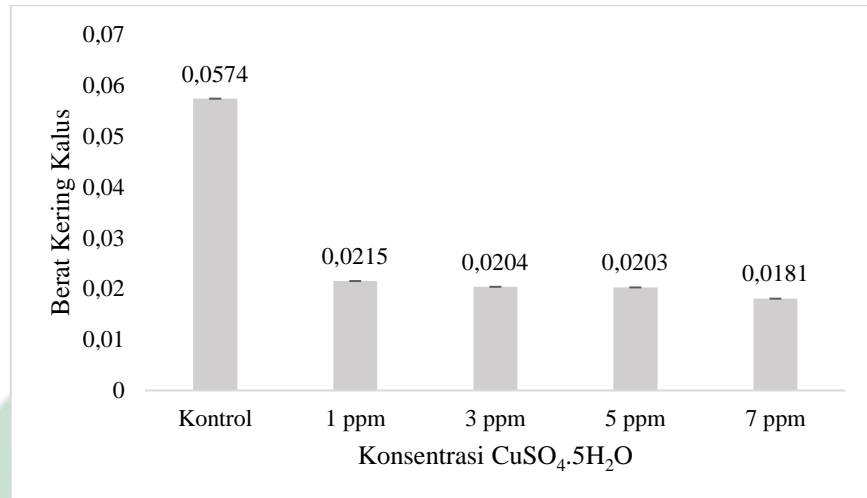
Perlakuan	Rata-Rata \pm Standar Deviasi	P value Anova
A	0,0574 \pm 0,0148 ^{abcd}	0,0001
B	0,0215 \pm 0,0122 ^a	
C	0,0204 \pm 0,0076 ^b	
D	0,0203 \pm 0,0052 ^c	
E	0,0181 \pm 0,0021 ^d	

Keterangan: A= 0 ppm CuSO₄.5H₂O, B= 1 ppm CuSO₄.5H₂O, C= 3 ppm CuSO₄.5H₂O, D= 5 ppm CuSO₄.5H₂O, E= 7 ppm CuSO₄.5H₂O, abcd= Perbedaan signifikan antar kelompok berat kering kalus

Berdasarkan tabel diatas diketahui bahwa kelompok yang mengalami perbedaan yang signifikan yaitu kelompok kontrol dengan 1 ppm, kontrol dengan 3 ppm, kontrol dengan 5 ppm, dan kontrol dengan 7 ppm dengan nilai *Asym. Sig* pada semua kelompok kurang dari alpha yaitu (0,000 < 0,05). Perbedaan yang signifikan tersebut diduga karena dipengaruhi oleh berat kering kalus yang dihasilkan pada kultur kalus tanaman insulin, dan jenis media kultur. Setiawati *et al.* (2021) dalam penelitiannya menyatakan bahwa berat kering kalus dipengaruhi oleh kecepatan sel-sel membelah diri, memperbanyak diri dan kemudian sel mengalami pembesaran. Sedangkan kecepatan sel-sel itu sendiri dipengaruhi oleh jenis tumbuhan, susunan media pertumbuhan, ketersediaan unsur hara mikro atau makro, karbohidrat, adanya bahan tambahan seperti elisitor, serta faktor lain seperti cahaya, suhu, dan pH media (Gunawan, 1994).

Sama halnya seperti berat segar kalus, susunan media yang paling optimal dalam menghasilkan berat kering kalus tanaman insulin tertinggi

yaitu pada perlakuan kontrol (0 ppm) tanpa penambahan elisitor $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ yang dapat dilihat pada gambar 4.4.



Gambar 4.4 Grafik Rata-Rata Berat Kering Kalus
(Sumber Pribadi, 2023)

Berdasarkan gambar 4.4 diatas diketahui bahwa rata-rata berat kering kalus tertinggi terjadi pada perlakuan kontrol (0 ppm) tanpa penambahan elisitor $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ yaitu 0,0574 gram, sedangkan rata-rata berat segar kalus terendah terjadi pada perlakuan dengan konsentrasi $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ tertinggi (7 ppm) yaitu 0,01818 gram. Berat kering dan berat basah kalus dalam penelitian ini memiliki korelasi. Nilai rata-rata berat segar kalus yang tertinggi juga menghasilkan rata-rata berat kering kalus yang tinggi pula. Begitupun sebaliknya, Nilai rata-rata berat segar kalus yang terendah juga menghasilkan rata-rata berat kering kalus yang rendah pula.

Hal tersebut selaras dengan penelitian yang dilakukan oleh Jannah *et al.* (2016) yang menghasilkan berat segar dan berat kering kalus saling berkorelasi, dimana tertinggi yaitu 1,0124 gram dari berat segar, dan

0,7682 gram dari berat kering. Sedangkan terendah yaitu 0,1944 gram dari berat segar, dan 0,7388 gram dari berat kering. Hardiyanto *et al.* (2004) juga menambahkan bahwa berat segar dan berat kering kalus merupakan 2 faktor yang berhubungan/berkorelasi positif.

4.2 Pengaruh Pemberian Variasi Elisitor $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ Terhadap Produksi Flavonoid dan Fenolik Total

4.2.1 Flavonoid

Salah satu jenis metabolit sekunder yang ditemukan pada tanaman insulin adalah flavonoid. Flavonoid termasuk senyawa fenol yang keberadaannya ditemukan paling besar di alam yang memiliki kemampuan sebagai antioksidan dan mempunyai bioaktivitas sebagai obat (Tehubijuluw *et al.*, 2018). Flavonol merupakan salah satu jenis flavonoid yang paling banyak ditemukan pada tumbuhan. Flavonol sendiri terdiri dari kuersetin, kaemferol, dan mirisetin. Kuersetin merupakan komponen terbanyak yang ditemukan pada suatu tanaman (Vifta *et al.*, 2021).

Pada penelitian ini untuk mengetahui kandungan flavonoid pada tanaman insulin dilakukan ekstraksi pada kalus yang didapat dengan menggunakan metode maserasi. Maserasi merupakan salah satu metode ekstraksi yang dilakukan dengan cara merendam sampel menggunakan pelarut pada temperatur ruangan. Sampel tumbuhan akan mengalami pemecahan dinding sel dan membran sel ketika proses perendaman berlangsung akibat perbedaan tekanan antara didalam dan diluar sel,

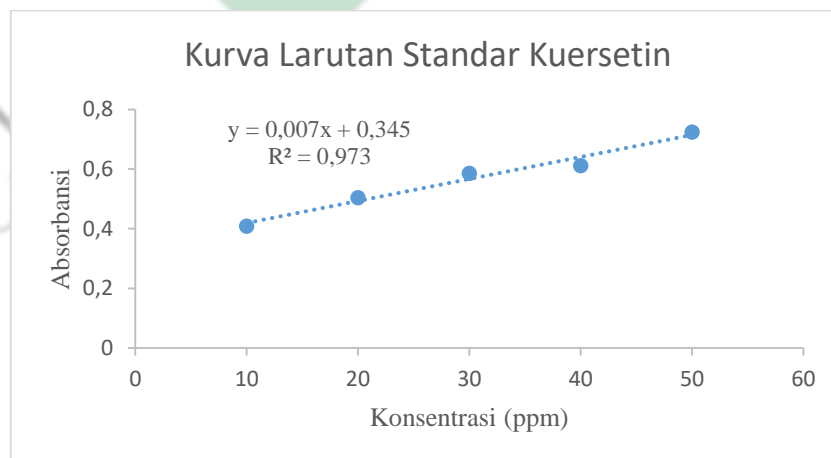
sehingga metabolit sekunder yang ada didalam sitoplasma dapat terlarut dalam pelarut (Handayani & Nurcahyanti, 2015).

Pelarut yang digunakan dalam proses maserasi tersebut yaitu pelarut metanol. Penggunaan metanol sebagai pelarut dalam penelitian ini yaitu karena metanol merupakan pelarut yang mampu melarutkan senyawa baik yang bersifat polar ataupun non polar, seperti flavonoid, alkaloid, steroid, dan saponin sehingga dapat menarik lebih senyawa kimia dalam tanaman (Surahmaida & Umarudin (2019). Ekstrak yang didapat pada proses maserasi selanjutnya dipartisis menggunakan n-heksana. n-heksana merupakan senyawa yang bersifat non polar sehingga dapat menarik senyawa-senyawa yang juga bersifat non polar, sebab flavonoid yang akan diuji merupakan senyawa polar (Rahayu *et al.*, 2015). Selain dipartisi dengan n-heksana, ekstrak juga selanjutnya dipartisi dengan menggunakan etil asetat dengan tujuan untuk menyari senyawa flavonoid, karena etil asetat merupakan penyari yang dapat menyari senyawa-senyawa yang mempunyai aktivitas antibakteri seperti flavonoid dan fenolik dalam konsentrasi yang besar (Indarto *et al.*, 2019).

Senyawa flavonoid pada kalus tanaman insulin diukur dengan menggunakan spektrofotometer UV-VIS dengan alasan karena flavonoid mengandung sistem aromatik yang terkonjugasi sehingga menunjukkan pita serapan kuat pada daerah spektrum sinar ultraviolet dan spektrum sinar tampak (Aminah *et al.*, 2017). Larutan standar yang digunakan dalam penelitian yaitu larutan standar kuersetin dengan beberapa deret

konsentrasi. Menggunakan kuersetin sebagai larutan standar yaitu karena kuersetin mempunyai karakteristik yang sama dengan flavonoid, penyebarannya pada tanaman merupakan yang paling luas, kuersetin dan glikosidanya berada dalam jumlah sekitar 60-70% dari flavonoid, serta kuersetin juga merupakan salah satu senyawa golongan flavonoid yang dapat bereaksi dengan $AlCl_3$ membentuk kompleks (Vifta *et al.*, 2021; Silvia *et al.*, 2022).

Berdasarkan hasil spektrofotometer UV-Vis diperoleh nilai absorbansi larutan standar kuersetin pada masing-masing konsentrasi, dan didapatkan kurva kalibrasi dari perolehan nilai absorbansi tersebut (gambar 4.5). Perbandingan antara konsentrasi dengan nilai absorbansi disebut dengan kurva kalibrasi. Nilai absorbansi akan semakin besar ketika konsentrasi larutan juga semakin besar (Pratiwi *et al.*, 2020).



Gambar 4.5 Kurva Larutan Standar Kuersetin Pada Panjang Gelombang 514 nm (Sumber Pribadi, 2023)

Berdasarkan gambar 4.5 diketahui bahwa kurva kalibrasi pada panjang gelombang 514 nm memiliki persamaan regresi untuk absorbansi kuersetin

pada deret konsentrasi 10, 20, 30, 40, dan 50 ppm yaitu $Y = 0,007X + 0,345$. Konsentrasi senyawa kuersetin pada kalus dapat diketahui melalui persamaan tersebut dengan memasukkan nilai absorbansi sampel pada variabel y, sehingga didapatkan nilai x yang merupakan jumlah konsentrasi kuersetin dalam ekstrak kalus tanaman insulin. Kadar konsentrasi flavonoid kalus tanaman insulin dapat dilihat pada tabel 4.7 berikut:

Tabel 4.7 Kadar Konsentrasi Flavonoid Kultur Kalus Insulin

Konsentrasi $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (ppm)	Konsentrasi Flavonoid (mg/L)	Rata-Rata Konsentrasi Flavonoid (mg/L)
A	117,714 92	104,857
B	142,571 136,285	139,428
C	56,285 55	55,642
D	31,714 60,714	46,214
E	42 42,857	42,428
Daun tanaman induk	136,428 134,857	135,642

Keterangan: A= 0 ppm $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, B= 1 ppm $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, C= 3 ppm $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, D= 5 ppm $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, E= 7 ppm $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

Berdasarkan tabel 4.7 diatas dapat diketahui bahwa rata-rata konsentrasi flavonoid kalus tanaman insulin pada perlakuan 0 ppm (tidak ada penambahan elisitor) yaitu sebesar 104,857 mg/L, perlakuan 1 ppm yaitu 139,428 mg/L, perlakuan 3 ppm yaitu 55,642 mg/L, perlakuan 5 ppm yaitu 46,214 mg/L, dan perlakuan 7 ppm yaitu 42,428 mg/L. Berdasarkan nilai yang diperoleh tersebut dapat dikatakan bahwa penambahan elisitor $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dapat meningkatkan kandungan flavonoid pada tanaman, hal

tersebut terbukti pada perlakuan 1 ppm dimana nilai yang diperoleh lebih besar daripada perlakuan kontrol maupun pada daun segar tanaman induk yaitu 104,857 mg/L pada perlakuan kontrol, dan 135,642 mg/L pada tanaman induknya. Hal ini sesuai dengan penelitian Faizah (2018), dimana kandungan flavonoid pada kultur akar tanaman sambung nyawa lebih tinggi yaitu 4,9906 mg/L dibandingkan dengan perlakuan kontrol yaitu 0,3763 mg/L. Berdasarkan uraian tersebut dapat dikatakan bahwa proses kultur jaringan dengan penambahan elisitor Cu dapat meningkatkan kandungan metabolit sekunder dibandingkan dengan daun segar dan perlakuan kontrol.

Keberadaan Cu berperan dalam meningkatkan metabolit sekunder karena Cu berperan sebagai elisitor. Elisitor dapat mengaktifkan gen dalam tumbuhan yang akan mengkode enzim yang diperlukan untuk sintesis fitoaleksin dan meningkatkan berbagai metabolit sekunder dan enzim lain.

Selain itu, penambahan elisitor pada kultur kalus dan kultur sel dapat menginduksi senyawa metabolit sekunder yang bukan fitoaleksin (Habibah, 2009). Penggunaan elisitor Cu untuk memproduksi metabolit sekunder juga diduga berhubungan dengan DNA yang terdapat pada inti sel tumbuhan dengan cara masuknya elisitor kedalam sel melalui reseptor yang terdapat pada membran sel yang kemudian dihantarkan kedalam sistem *messenger intracellular* melalui aktivasi fosfolipase dalam sel kemudian elisitor dapat mengubah ekspresi gen yang dapat mengaktifkan transkripsi gen-gen untuk biosintesa metabolit sekunder (Sholikhah, 2014).

Tembaga (Cu) juga merupakan salah satu logam berat yang esensial bagi pertumbuhan tanaman tetapi dapat juga menjadi cekaman abiotik yang menginduksi pembentukan spesies oksigen relatif (ROS). Pada tanaman, produksi ROS dapat menyebabkan tanaman mengaktifkan mekanisme pertahanan tanaman seperti memproduksi flavonoid sebagai antioksidan (Ferreira & Casati, 2012). Penambahan elisitor Cu dilaporkan dapat meningkatkan metabolit sekunder seperti katekin pada kalus teh (*Camellia sinensis* L.) (Retnaningati *et al.*, 2019), asam fenolat pada kultur pucuk *Artemisia annua* (Darki *et al.*, 2019), bacoside dalam kultur pucuk *Bacopa monnieri* (Sharma *et al.*, 2015), serta stigmaserol dan sitosterol dalam kultur kalus purwoceng (*Pimpinella alpine* Molk.) (Sahin *et al.*, 2017).

Berbeda halnya dengan penambahan elisitor pada konsentrasi tinggi yaitu 3, 5, dan 7 ppm menghasilkan rata-rata metabolit sekunder yang cukup rendah yaitu 55,642 mg/L, 46,214 mg/L, dan 42,428 mg/L secara berurutan dibandingkan dengan perlakuan kontrol yaitu 104,857 mg/L. Berdasarkan hasil tersebut dapat dikatakan bahwa semakin meningkatnya konsentrasi elisitor yang ditambahkan kedalam media kultur maka senyawa flavonoid yang dihasilkan semakin menurun. Penurunan tersebut diduga terjadi karena konsentrasi elisitor pada media kultur melebihi batas optimum. Retnaningati *et al.* (2021) menyatakan bahwa terhambatnya produksi senyawa metabolit terjadi seiring dengan menurunnya produksi biomassa yang akan berefek pada menurunnya induksi enzim

phenylalanine ammonia lyase (PAL) karena elisitor yang diberikan terlalu banyak. Selain itu, turunnya kandungan flavonoid total pada kalus tanaman insulin juga disebabkan karena adanya akumulasi CuSO_4 sehingga menciptakan kondisi stress tanaman. Tembaga (Cu) merupakan mikronutrient yang penting untuk perkembangan tanaman dan menjadi kofaktor enzim dalam berbagai proses fisiologis (Chung *et al.*, 2019). Tetapi Cu dalam konsentrasi yang tinggi memberikan efek toksik bagi tanaman (Nilamasari & Rachmadiarti, 2019). Menurunnya kadar flavonoid akibat pemberian konsentrasi tinggi CuSO_4 selaras dengan penelitian yang dilakukan oleh Faizah (2018) yang menghasilkan kadar flavonoid rendah yaitu 0,7068 mg/L pada pemberian konsentrasi tinggi CuSO_4 dibandingkan pada konsentrasi rendah yaitu 4,9906 mg/L.

Sedangkan pada perlakuan kontrol, lebih tingginya kadar flavonoid total dibandingkan pada perlakuan konsentrasi tinggi diduga disebabkan karena pengaruh zat pengatur tumbuh. ZPT yang digunakan pada semua perlakuan sama yaitu NAA 4 ppm + BAP 1,5 ppm, hanya saja pada perlakuan kontrol tidak ditambahkan elisitor (0 ppm). Interaksi antara NAA dan BAP dapat mempengaruhi produksi metabolit sekunder karena zat pengatur tumbuh tersebut melalui kerja enzim dapat menyebabkan perubahan fisiologi dan biokimia. Zat pengatur tumbuh berperan dalam pengikatan membran protein yang berperan dalam aktivitas enzim. Hasil pengikatan tersebut akan mengaktifkan enzim dan mengubah substrat menjadi beberapa produk baru. Produk-produk tersebut mengakibatkan

terjadinya reaksi-reaksi sekunder seperti pembentukan metabolit sekunder (Wardani *et al.*, 2004; Mahmudah, 2021).

Apabila dibandingkan dengan kadar flavonoid pada daun tanaman induk, perlakuan kontrol dan perlakuan dengan konsentrasi $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ yang tinggi (3, 5, 7 ppm) kadar total flavonoidnya lebih rendah. Kejadian tersebut sebanding dengan penelitian yang dilakukan oleh Faizah (2018) yang menghasilkan kadar flavonoid total tertinggi pada akar tanaman induknya yaitu sebesar 84002 mg/L dibandingkan dengan perlakuan kontrol dan penambahan elisitor $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

Hal tersebut diduga terjadi karena kurang tepatnya waktu dan lama penambahan elisitor. Menurut Pandiangan (2011) menyatakan bahwa penggunaan elisitor untuk meningkatkan kandungan metabolit sekunder secara optimal dipengaruhi oleh konsentrasi elisitor, waktu penambahan elisitor, dan pertumbuhan sel dalam kultur. Penambahan elisitor dalam kultur jaringan hingga mencapai dosis tertentu mampu mempengaruhi akumulasi senyawa metabolit sekunder. Hal ini disebabkan karena elisitor dapat berfungsi sebagai pemicu terhadap aktivitas enzim, dan membran sel sehingga berpengaruh terhadap metabolisme, hasil metabolisme, dan pertumbuhan sel. Sehingga perlu diketahui waktu dan lama penambahan elisitor yang optimal untuk mengetahui produksi fenolik yang optimum pada kultur kalus insulin.

4.2.2 Fenolik

Senyawa metabolit sekunder pada tanaman insulin selain dari jenis flavonoid terdapat juga senyawa fenolik. Fenolik merupakan senyawa yang memiliki gugus hidroksil dan paling banyak terdapat pada tanaman khususnya tanaman yang memiliki senyawa aromatik yang memiliki karakteristik struktur benzen dan hidroksil (Diniyah & Lee, 2020; Hakim, 2020). Golongan senyawa fenolik yang terkandung pada daun *T. diversifolia* yaitu fenol dan polifenol (Odeyemi *et al.*, 2014; Solfaine *et al.*, 2021). Fenolik juga merupakan senyawa metabolit sekunder bioaktif yang memiliki kemampuan sebagai antioksidan, antikarsinogenik, antimikroba, dan sebagainya (Diniyah & Lee, 2020).

Pada penelitian ini untuk mengetahui kandungan fenolik pada tanaman insulin dilakukan hal yang sama seperti pada uji flavonoid yaitu mengekstraksi kalus yang didapat dengan menggunakan metode maserasi.

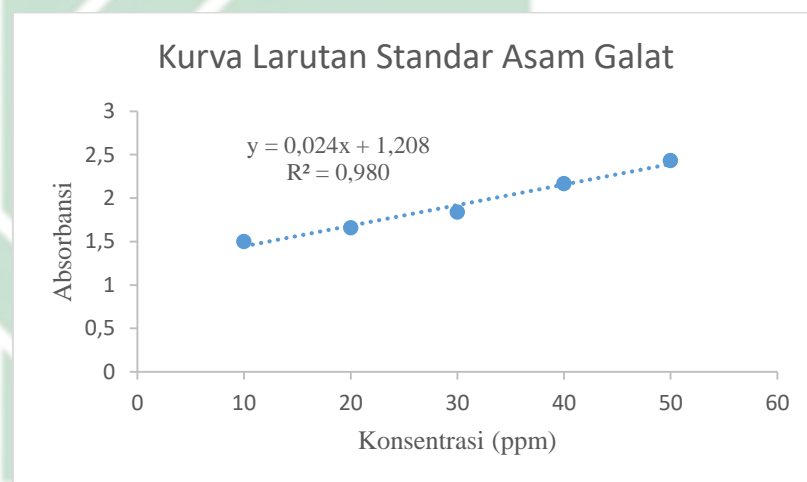
Maserasi merupakan salah satu metode ekstraksi yang dilakukan dengan cara merendam sampel menggunakan pelarut pada temperatur ruangan. Sampel tumbuhan akan mengalami pemecahan dinding sel dan membran sel ketika proses perendaman berlangsung akibat perbedaan tekanan antara didalam dan diluar sel, sehingga metabolit sekunder yang ada didalam sitoplasma dapat terlarut dalam pelarut (Handayani & Nurcahyanti, 2015).

Pelarut yang digunakan dalam proses maserasi tersebut yaitu pelarut metanol. Penggunaan metanol sebagai pelarut dalam penelitian ini yaitu karena metanol merupakan pelarut yang mampu melarutkan senyawa baik

yang bersifat polar ataupun non polar, seperti fenolik, flavonoid, alkaloid, steroid, dan saponin sehingga dapat menarik lebih senyawa kimia dalam tanaman (Surahmaida & Umarudin (2019). Ekstrak yang didapat pada proses maserasi selanjutnya dipartisi menggunakan n-heksana. n-heksana merupakan senyawa yang bersifat non polar sehingga dapat menarik senyawa-senyawa yang juga bersifat non polar, sebab fenolik yang akan diuji merupakan senyawa polar (Rahayu *et al.*, 2015). Selain dipartisi dengan n-heksana, ekstrak juga selanjutnya dipartisi dengan menggunakan etil asetat dengan tujuan untuk menyari senyawa fenolik, karena etil asetat merupakan penyari yang dapat menyari senyawa-senyawa yang mempunyai aktivitas antibakteri seperti flavonoid dan fenolik dalam konsentrasi yang besar (Indarto *et al.*, 2019).

Senyawa fenolik pada kalus tanaman insulin diukur dengan menggunakan spektrofotometer UV-VIS dengan alasan karena fenolik mengandung sistem aromatik yang terkonjugasi sehingga menunjukkan pita serapan kuat pada daerah spektrum sinar ultraviolet dan spektrum sinar tampak (Aminah *et al.*, 2017). Larutan standar yang digunakan dalam penelitian yaitu larutan standar asam galat dengan beberapa deret konsentrasi. Penggunaan asam galat sebagai larutan standar yaitu karena asam galat merupakan senyawa alami dan stabil. Menurut Ahmad *et al.*, (2015) asam galat merupakan senyawa turunan dari asam hidroksibenzoat yang tergolong asam fenol sederhana dan bersifat stabil.

Berdasarkan hasil spektrofotometer UV-Vis diperoleh nilai absorbansi larutan standar kuersetin pada masing-masing konsentrasi, dan didapatkan kurva kalibrasi dari perolehan nilai absorbansi tersebut (gambar 4.6). Perbandingan antara konsentrasi dengan nilai absorbansi disebut dengan kurva kalibrasi. Nilai absorbansi akan semakin besar ketika konsentrasi larutan juga semakin besar (Pratiwi *et al.*, 2020).



Gambar 4.6 Kurva Larutan Standar Asam Galat Pada Panjang Gelombang 760 nm

(Dokumen Pribadi, 2023)

Berdasarkan gambar 4.6 diketahui bahwa kurva kalibrasi pada panjang gelombang 760 nm memiliki persamaan regresi untuk absorbansi asam galat pada deret konsentrasi 10, 20, 30, 40, dan 50 ppm yaitu $Y = 0,024X + 1,208$. Konsentrasi senyawa asam galat pada kalus dapat diketahui melalui persamaan tersebut dengan memasukkan nilai absorbansi sampel pada variabel y, sehingga didapatkan nilai x yang merupakan jumlah konsentrasi asam galat dalam ekstrak kalus tanaman insulin. Kadar

konsentrasi fenolik kalus tanaman insulin dapat dilihat pada tabel 4.8 berikut:

Tabel 4.8 Kadar Konsentrasi Fenolik Kultur Kalus Insulin

Konsentrasi CuSO ₄ .5H ₂ O (ppm)	Konsentrasi Fenolik (mg/ml)	Rata-Rata Konsentrasi Fenolik (mg/L)
A	51,583	48,354
	45,125	
B	78,125	77,687
	77,25	
C	58,041	54,749
	51,458	
D	53,666	53,499
	53,333	
E	50,791	50,895
	51	
Daun tanaman induk	80,625	79,541
	78,458	

Keterangan: A= 0 ppm CuSO₄.5H₂O, B= 1 ppm CuSO₄.5H₂O, C= 3 ppm CuSO₄.5H₂O, D= 5 ppm CuSO₄.5H₂O, E= 7 ppm CuSO₄.5H₂O

Berdasarkan tabel diatas dapat diketahui bahwa rata-rata konsentrasi fenolik kalus tanaman insulin pada perlakuan 0 ppm (tidak ada penambahan elisitor) yaitu sebesar 48,354 mg/L, perlakuan 1 ppm yaitu 77,687 mg/L, perlakuan 3 ppm yaitu 54,749 mg/L, perlakuan 5 ppm yaitu 53,499 mg/L, dan perlakuan 7 ppm yaitu 50,895 mg/L. Berdasarkan nilai yang diperoleh tersebut dapat dikatakan bahwa penambahan elisitor CuSO₄.5H₂O dapat meningkatkan kandungan fenolik pada tanaman, hal tersebut terbukti pada semua perlakuan nilai yang diperoleh lebih besar daripada perlakuan kontrol. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Zarad *et al.* (2021) yang mengasilkan kadar fenolik total kultur kalus *Artemisia annua* lebih tinggi pada konsentrasi CuSO₄ 2 mg/L yaitu 8,75

mg/gr daripada perlakuan kontrolnya yaitu 6,66 mg/L. Penggunaan CuSO_4 dalam konsentrasi tinggi untuk analisis kandungan fenolik juga dilakukan oleh Darki *et al.* (2019) yang menghasilkan kadar fenolik total yaitu 2,5 mg/gr dari perlakuan kontrol 1,7 mg/gr.

Adanya Tembaga (Cu) dalam hal ini berperan untuk meningkatkan metabolit sekunder karena Cu berperan sebagai elisitor. Elisitor dapat mengaktifkan gen dalam tumbuhan yang akan mengkode enzim yang diperlukan untuk sintesis fitoaleksin dan meningkatkan berbagai metabolit sekunder dan enzim lain. Selain itu, penambahan elisitor pada kultur kalus dan kultur sel dapat menginduksi senyawa metabolit sekunder yang bukan fitoaleksin (Habibah, 2009). Penggunaan elisitor Cu untuk memproduksi metabolit sekunder juga diduga berhubungan dengan DNA yang terdapat pada inti sel tumbuhan dengan cara masuknya elisitor kedalam sel melalui reseptor yang terdapat pada membran sel yang kemudian dihantarkan kedalam sistem *messenger intracellular* melalui aktivasi fosfolipase dalam sel kemudian elisitor dapat mengubah ekspresi gen yang dapat mengaktifkan transkripsi gen-gen untuk biosintesa metabolit sekunder (Sholikhah, 2014).

Selain dipengaruhi oleh elisitor, kadar fenolik total kultur kalus juga dipengaruhi oleh tekstur kalus yang dihasilkan. Tekstur kalus yang dihasilkan pada penelitian ini yaitu bertekstur kompak pada kalus yang ditambahkan elisitor, dan bertekstur remah pada perlakuan kontrol. Kalus yang bertekstur kompak tersebut menghasilkan senyawa metabolit

sekunder yang lebih tinggi. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Manuhara (2001) yang menyatakan bahwa kalus yang memiliki tekstur kompak dan intermediet akan menghasilkan kandungan metabolit sekunder yang lebih tinggi daripada kalus yang bertekstur remah. Meningkatnya kandungan senyawa metabolit pada kalus kompak tersebut disebabkan karena kalus mengalami perhambatan pertumbuhan sebab masih berada dalam fase stasioner, sedangkan kalus yang bertekstur remah memiliki masa pembelahan sel lebih cepat sehingga produksi metabolit sekundernya menurun (Mahmudah, 2018).

Walaupun pada konsentrasi tinggi $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ menghasilkan kadar fenol yang tinggi dibandingkan dengan kontrol, tetapi kandungan fenolik kultur kalus masih lebih rendah dibandingkan dengan daun tanaman induk yaitu 79,541 mg/L dari perlakuan dengan konsentrasi fenol tertinggi yaitu 77,687 mg/L. Hal ini diduga terjadi karena kurang tepatnya waktu dan lama penambahan elisitor. Menurut Pandiangan (2011) menyatakan bahwa penggunaan elisitor untuk meningkatkan kandungan metabolit sekunder secara optimal dipengaruhi oleh konsentrasi elisitor, waktu penambahan elisitor, dan pertumbuhan sel dalam kultur. Penambahan elisitor dalam kultur jaringan hingga mencapai dosis tertentu mampu mempengaruhi akumulasi senyawa metabolit sekunder. Hal ini disebabkan karena elisitor dapat berfungsi sebagai pemicu terhadap aktivitas enzim, dan membran sel sehingga berpengaruh terhadap metabolisme, hasil metabolisme, dan pertumbuhan sel. Sehingga perlu diketahui waktu dan lama penambahan

elisitor yang optimal untuk mengetahui produksi fenolik yang optimum pada kultur kalus insulin.

Pada penelitian ini elisitor $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ yang digunakan terdiri dari konsentrasi yang berbeda-beda dan menghasilkan kalus serta senyawa metabolit sekunder yang berbeda-beda pula. Sebagaimana firman Allah SWT dalam al-Qur'an surah Al-Qamar ayat 49 yang berbunyi:

أَنَا كُلَّ شَيْءٍ خَلَقْنَاهُ بِقَدَرٍ

Artinya: " *Sesungguhnya Kami menciptakan sesuatu menurut ukuran.* "

Dalam kitab tafsir Jalalain, kalimat "بِقَدَرٍ خَلَقْنَاهُ" Kami menciptakannya menurut ukuran", yang dimaksud dalam kalimat tersebut yaitu sesuai dengan taqdir (As-Suyuthi, 2010). Menurut Al-Sheikh (1994) dalam kitab tafsir Ibnu Katsir menjelaskan bahwa Dia (Allah SWT) menetapkan suatu ukuran dan memberikan petunjuk terhadap semua makhluk hidup kepada ketetapan tersebut. Selain itu, kata قدر memiliki makna ketentuan, dari segi bahasa kata tersebut memiliki makna kadar tertentu yang tidak bertambah atau berkurang. Ayat di atas menjelaskan bahwa Allah SWT menetapkan segala sesuatu termasuk ketentuan dan sistem yang ditetapkan tidak hanya terbatas pada salah satu aspek saja. Sesungguhnya Allah SWT menciptakan segala sesuatu untuk memberi potensi yang sesuai dengan ukuran yang cukup yang bertujuan untuk mempertahankan satu keseimbangan (Shihab, 2003).

Ayat tersebut terdapat keterkaitan dengan penelitian dimana banyaknya konsentrasi elisitor yang efektif dalam produksi metabolit sekunder kultur

kalus insulin yaitu pada konsentrasi 1 ppm menghasilkan kadar total flavonoid dan fenolik tertinggi dibandingkan dengan konsentrasi yang lain. Hal tersebut membuktikan bahwa Allah SWT memiliki kekuasaan yang luar biasa. Tanaman insulin mampu tumbuh dalam lingkungan yang berbeda dari habitat aslinya yaitu kultur jaringan. Eksplan dari tanaman insulin dapat tumbuh membentuk kalus pada media yang tepat sehingga menghasilkan senyawa metabolit yang tinggi yang memiliki banyak manfaat. Berdasarkan hal tersebut kita dapat mengambil pelajaran bahwa Allah SWT telah mengatur semuanya sesuai dengan kehendak dan kekuasaan-Nya.

Hasil uji kandungan flavonoid dan fenolik menunjukkan bahwa kalus tanaman insulin menghasilkan kadar flavonoid tertinggi yaitu 139,428 mg/ml, dan kadar fenolik tertinggi 77,687 mg/ml. Kedua senyawa tersebut memiliki banyak manfaat dalam kesehatan, misalnya flavonoid memiliki manfaat sebagai antibiotik, mencegah keropos tulang, melindungi struktur sel, dan meningkatkan efektifitas vitamin C (Ladeska *et al.*, 2019). Sedangkan fenolik memiliki manfaat sebagai antioksidan, mencegah beberapa gangguan penyakit seperti diabetes, kanker, dan disfungsi otak (Gard *et al.*, 2016). Hadits riwayat Imam Muslim dari Jabir bin Abdillah bahwa Nabi Muhammad SAW bersabda:

حَدَّثَنَا هَارُونُ بْنُ مَعْرُوفٍ وَأَبُو الطَّاهِرِ وَأَحْمَدُ بْنُ عِيسَى قَالُوا حَدَّثَنَا ابْنُ وَهْبٍ أَخْبَرَنِي عَمْرُو وَهُوَ ابْنُ الْحَارِثِ عَنْ عَبْدِ رَبِّهِ بْنِ سَعِيدٍ عَنْ أَبِي الزُّبَيْرِ عَنْ جَابِرٍ

عَنْ رَسُولِ اللَّهِ صَلَّى اللَّهُ عَلَيْهِ وَسَلَّمَ أَنَّهُ قَالَ لِكُلِّ دَاءٍ دَوَاءٌ فَإِذَا أُصِيبَ دَوَاءُ الدَّاءِ
بِرَأٍ بِإِذْنِ اللَّهِ عَزَّ وَجَلَّ

Artinya: “Telah menceritakan kepada kami Harun bin Ma'ruf dan Abu Ath Thahir serta Ahmad bin 'Isa mereka berkata, telah menceritakan kepada kami Ibnu Wahb, telah mengabarkan kepadaku 'Amru yaitu Ibnu Al Harits dari 'Abdu Rabbih bin Sa'id dari Abu Az Zubair dari Jabir dari Rasulullah ﷺ, beliau bersabda, "Setiap penyakit ada obatnya. Apabila ditemukan obat yang tepat untuk suatu penyakit, maka akan sembuhlah penyakit itu dengan izin Allah 'Azza wa Jalla.” (HR. Muslim no. 2204).

Berdasarkan hadits diatas diatas dijelaskan bahwa Allah yang menciptakan penyakit dan Allah pula yang menciptakan obat atas penyakit tersebut, kemudian Allah menyembuhkan manusia yang sakit tersebut atas kehendak-Nya. Setiap yang Allah ciptakan didunia ini pasti ada hikmahnya, seperti halnya dengan tumbuhan yang Allah ciptakan memiliki banyak manfaat khususnya sebagai obat. Manusia dapat memanfaatkan tanaman tersebut sebagai obat, sebagaimana pada penelitian ini digunakan tanaman insulin yang memiliki berbagai manfaat untuk digunakan sebagai obat tradisional seperti diabetes, malaria, diare, sakit tenggorokan, nyeri haid, dan peradangan (Tona, *et al.*, 2000; Chunudom *et al.*, 2019). Sungguh Allah SWT berkuasa menciptakan dan menumbuhkan tumbuh-tumbuhan dengan sempurna.

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa:

1. Berbagai konsentrasi elisitor $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ memiliki pengaruh yang signifikan pada pertumbuhan kalus. Warna kalus yang dihasilkan bervariasi yaitu putih kekuningan, kuning kemerahan, putih kehijauan, dan kuning kecoklatan. Kemudian tekstur kalus yang dihasilkan remah dan kompak. Selain itu terdapat perbedaan yang signifikan terhadap berat segar dan berat kering kalus, dimana nilai rata-rata berat segar dan berat kering kalus tertinggi terdapat pada perlakuan 0 ppm yaitu sebesar 0,144397 gram dan 0,0575 gram.
2. Konsentrasi elisitor $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ berpengaruh terhadap produksi flavonoid dan fenolik kalus tanaman insulin, dimana kadar flavonoid dan fenolik tertinggi terdapat pada perlakuan 1 ppm yaitu sebesar 139,428 mg/L dan 77,687 mg/L.

5.2 Saran

Dibutuhkan penelitian lebih lanjut mengenai pengaruh elisitor $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ terhadap pertumbuhan kalus dengan menggunakan konsentrasi atau jenis elisitor yang berbeda. Pada uji senyawa metabolit, diperlukan analisis untuk mengetahui waktu dan lama penambahan elisitor yang optimal untuk menghasilkan kadar fenolik yang optimum pada kultur kalus insulin. Selain itu, diperlukan analisis mengenai pengaruh elisitor $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dalam meningkatkan senyawa metabolit

sekunder dengan menggunakan standar senyawa dan metode uji yang berbeda pada kalus tanaman insulin (*Tithonia diversifolia*).



UIN SUNAN AMPEL
S U R A B A Y A

DAFTAR PUSTAKA

- Abdillah, D., Raden, S., dan Tri, A. S. 2015. Pengaruh Cekaman Kekeringan Terhadap Kandungan Fenolik dan Antioksidan Tanaman Sorgum (*Sorghum bicolor* L. Moench) Pada Fase Awal Vegetatif. *Berkala Ilmiah Pertanian*, 1-4.
- Afolayan, F. I. D., Olayemi, A., Nicholas, N. W., Jennifer, O., and Chiaka, A. 2020. Cytokine modulation during malaria infections by some medicinal plants. *Scientific African*, 8 (e00428): 1-14.
- Ahayu, S. I. T. I. R., Urniasih, N. U. K., & Malia, D. A. N. V. I. N. A. A. (2015). L Imbah K Ulit B Awang M Erah Sebagai a Ntioksidan a Lami. *Al Kimiya*, 2(1), 1–8.
- Ahloowalia, B. S., Prakash, J., Savangikar, V. A., dan Savangikar, C. 2004. Low Cost Options for Tissue Culture Technology in Developing Countries. *Proceedings of a Technical Meeting organized by the Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture and held in Vienna*. IAEA, Australia.
- Ahmad, A. K., Juwita., & Siti, A. D. R. (2015). Penetapan Kadar Fenolik dan Flavonoid Total Ekstrak Metanol Buah dan Daun Patikala (*Etlingera elatior* (Jack) RM SM). *Ilmu dan Riset Farmasi*, 2(1): 1-10.
- Alfaridz, F., dan Riezki, A. 2018. Review Jurnal: klasifikasi dan Aktivitas Farmakologi dari Senyawa Aktif Flavonoid. *Farmaka*, 16 (3): 1-9.
- Al-Sheikh, A. B. M. (2007). *Tafsir Ibnu Katsir Jilid 3*. Mu'assasa Daar Al-Hilal, kairo.
- Al-Snafi, A. E. 2014. The Pharmacology of Apium graveolens. A review. *International Journal for Pharmaceutical Research Scholars*, 3(1): 671-677.
- Amelia. 2018. Khasiat Tanaman Anting-Anting (*Acalypha indica* L.). *Majalah Farmasetika*, 3 (1): 7-11.
- Aminah, A., Tomayahu, N., & Abidin, Z. (2017). Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etanol Kulit Buah Alpukat (*Persea Americana* Mill.) Dengan Metode Spektrofotometri Uv-Vis. *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*, 4(2), 226–230. <https://doi.org/10.33096/jffi.v4i2.265>
- Anam, K. 2010. Pertumbuhan dan Kandungan Ursolic Acid Mutiara (*Hedyotis corymbosa* (L.) Lamk.) Pada Variasi Ketersediaan Air. Skripsi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sebelas Maret, Surakarta.

- Angin, Y. P., Yayuk, P., Yenni, A., Murni, S. R., dan Nurhayati. 2019. Pemanfaatan Kandungan Senyawa Metabolit Sekunder yang Dihasilkan Tanaman Pada Cekaman Biotik. *Agriland*, 7 (1): 39-47.
- Anjarwala, P., Ramni, J., Danil, A. O., dan Philip, C. S. 2013. Leaflet Tanaman Pestisida *Tithonia diversifolia* (Hemsley) A. Gray. *World Agroforestry Centre*, ISBN: 978-92-9059-347-8, 1-3.
- Arifin, B., dan Ibrahim, S. 2018. Struktur Biokativitas dan Antioksidan Flavonoid. *Jurnal Zarah*, 6 (1): 21-29.
- Ariningsih, I., Solichatun, S., & Anggarwulan, E. (2003). Callus growth and anthraquinones production of Indian mulberry (*Morinda citrifolia* L.) in Murashige-SkoogTMs medium (MS) supplemented with Ca²⁺ and Cu²⁺. *Biofarmasi Journal of Natural Product Biochemistry*, 1(2), 39–43. <https://doi.org/10.13057/biofar/f010201>
- Arsyam, A., Abdullah. dan Netty, S. S. 2020. Daya Regenerasi Kalus Eksplan Embrio Kedelai (*Glycine max* L.) Pada Berbagai Konsentrasi Hormon Tumbuh 2,4D dan BAP Secara In Vitro. *Jurnal Agrotekmas*, 1 (3): 8-15.
- Asmono, S. L., & Sari, V. K. (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*, 16(2), 116–121. <https://doi.org/10.25047/jii.v16i2.295>
- Assuyuthi, J. (2010). *Tafsir Jalalain. Terjemahan Bahrn Abu Bakar*. Sinar Baru Algensindo, Jakarta.
- Ath-Tabari, Abu Ja'far Muhammad bin Jarir. *Tafsir Jami' al-Bayan fi Tafsir al-Qur'an*, 10, Beirut: dar al Fikr, 1988.
- Azmi, R., & Handriatni, A. (2019). Pengaruh Macam Zat Pengatur Tumbuh Alami terhadap Pertumbuhan Setek Beberapa Klon Kopi Robusta (*Coffea canephora*). *Biofarm : Jurnal Ilmiah Pertanian*, 14(2). <https://doi.org/10.31941/biofarm.v14i2.794>
- Balazova, A., Blanarikova, V., Bilka, F., and Bilkova, A. 2008. Effect of Combined Biotic and Abiotic Elicitor on the Sanguinarine Formation in Cell Suspension Cultures of *Eschscholtiza Californica* Cham. *ACTA Facultatis Pharmaceutica*, 55: 58-63.
- Benjamin, E. D., Gali, A. I., Fartisincha, A. P., dan Abolade, S. A. 2019. Callus Culture for the Production of Therapeutic Compounds. *American Journal of Plant Biology*, 4 (4): 76-84.

- B, S., W, T., W, W., & Sumitro, S. B. (2008). Meningkatkan Produksi Flavan-3-Ol Melalui Kalus *Camellia Sinensis* L. Dengan Elisator Cu₂ plus. *Berkala Penelitian Hayati*, 14(1), 39–44. <https://doi.org/10.23869/bphjbr.14.1.20086>
- Butar-Butar, D. S. 2019. Uji Efek Ekstrak Etanol Daun Afrika (*Vernonia amygdalina* Del.) Dosis Bervariasi dan Ekstrak Etanol Daun Insulin (*Tithonia diversifolia* (Hemsly) A Gray) Dosis Tetap Terhadap Penurunan Kadar Gula Darah Pada Tikus Putih dengan Glibenklamid Sebagai Pembanding. *Skripsi*. Jurusan farmasi, Politeknik Kesehatan Kemenkes, Medan.
- Causonis, L., Mabb, L., Dengan, J. W., Naa, P., Acetic, N., Dan, A., & Amino, B. A. P. (2022). *Buletin Kebun Raya*. 25(2).
- Chung, M., Govindasamy, R., Umadevi S., Baskar V., and Muthu T. 2019. Impact of Copper Oxide Nanoparticles on Enhancement of Bioactive Compounds Using Cell Suspension Cultures of *Gymnema sylvestre* (Retz.) R. Br. *Applied Sciences*, 9 (10): 1-17.
- Chunudom, L., Montakan, T., Naymul, K., and Jitbanjong, T. 2019. Amelioration of Oxidative Stress and Pathological Alterations in Alloxan-induced Diabetes Mice by *Tithonia diversifolia* Leaves Extract. *Chiang Mai J Sci*, 46 (6): 1096-1106.
- Cotelle, N., Jean, L. B., Jean, P. C., Jean, P., Jean, C. W., dan Emille, M. G. 1996. Antioxidant Properties of Hydroxy-Flavones. *Radical Biology & Medicine*, 20 (1): 35-43.
- Cyntya, V. A., Santosa, G. W., Supriyantini, E., & Wulandari, S. Y. (2018). Pertumbuhan Rumput Laut *Gracilaria* sp. Dengan Rasio N:P Yang Berbeda. *Journal of Tropical Marine Science*, 1(1), 15–22. <https://doi.org/10.33019/jour.trop.mar.sci.v1i1.655>
- Dalimartha, S. 2000. Atlas Tumbuhan Obat Indonesia. Jakarta: Trubus Agriwidya.
- Darki, B. S., Leila S., Reyhaneh, P., and Seyed M. G. 2019. Effects of CuSO₄ and AgNO₃ on artemisinin and phenolic compound in shoot cultures of *Artemisia annua* L. *Journal of Plant Process and Function*, 8 (31) : 1-8.
- Dhurhania, C. E., dan Agil, N. 2018. Uji Kandungan Fenolik Total dan Pengaruhnya terhadap Aktivitas Antioksidan dari Berbagai Bentuk Sediaan Sarang Semut (*Myrmecodia pendens*). *Jurnal Farmasi dan Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 5 (2): 62-68.

- Diniyah, N., dan Sang-Han, L. 2020. Komposisi Senyawa Fenol dan Potensi Antioksidan dari Kacang-Kacangan: Review. *Jurnal Agroteknologi*, 14 (1): 91-102.
- Drew, R. A., dan M. K. Smith. 1990. Field Evaluation of Tissue Cultured Bananas in South-Eastern Queensland. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 30 (1): 569-574.
- Dykes, L., dan Rooney, L. W., Phenolic Compounds in Cereal Grains and Their Health Benefits. *Cereal Food World*, 52 (3): 105-111.
- Effert, T. 2019. Biotechnology Applications of Plant Callus Cultures. *Engineering*, 5 (1): 50-59.
- Eka Silvia N, Aldy Budi R, P. (2020). Perbandingan Kadar Flavonoid Total pada Daun dan Kulit Nanas menggunakan Metode Spektrofotometri Uv-Vis. *Prodi DIII Farmasi, Politeknik Harapan Bersama Tegal*, 09, 1–8.
- Fajarullah, A., Henky, I., dan Arief, P. 2014. Senyawa Metabolit Sekunder Lamun Thalassodendron Ciliatum Pada Pelarut. *Repository UMRAH*. 1 (1): 1-15.
- Faizah, H., Mulyadi, T., Hery, P., & Yosephine, S. W. M. (2018). Biomass and Flavonoid Production of *Gynura procumbens* (L.) Merr Adventitious Root Culture in Baloon-type Bubble-bioreactor Influenced by Elicitation. *Asian Journal of Plant Sciences*, 17(2): 107-119.
- Farreyra, M. L. F., S. P. Rius., & P. Casati. (2012). Flavonoids: Biosynthesis, Biological Functions and Biotechnological Applications. *Front. Plant Sci*, 3.
- Fatmawati, T. A., Nurhidayati, T., & Jadid, N. (2012). Pengaruh Kombinasi Konsentrasi ZPT NAA dan BAP pada Kultur Jaringan Tembakau *Nicotiana tabacum* var. Prancak 95. *Jurnal Sains Dan Seni Pomits*, 1(1), 1–6. <http://digilib.its.ac.id/public/ITS-Undergraduate-24095-Paper-438923.pdf>
- Fitri, M. S., Zairin, T., dan Essy, H. 2012. *In-Vitro* Effect of Combined Indole Butyric Acid (IBA) and Benzil Amino Purine (BAP) on the Planlet Growth of *Jatropha curcas* L. *Jurnal Natural*, 12 (1): 1-5.
- Fitriani, Y., & Gede Wijana, I. A. P. D. (2019). Teknik Sterilisasi Dan Efektivitas 2,4-D Terhadap Pembentukan Kalus Eksplan Daun Nilam (*Pogostemon Cablin Benth*) In Vitro. *J. Agric. Sci. and Biotechnol*, 8(1), 41–52.
- Fitrony. Rizqy, F., Lailatul, Q., dan Mahfud. 2013. Pembuatan Kristal Tembaga Sulfat Pentahidrat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) dari Tembaga Bekas Kumparan. *Jurnal Teknik Pomits*, 2 (1): 2337-3539.

- Galli, F. 2007. Interaction of Polyphenolic Compounds with Drug Disposition and Metabolism. *Current Drug Metabolism*, 8 (8): 830-838.
- Garg, N., Abdel-Aziz, S.M., & Aeron, A., 2016, *Microbes in Food and Health*, Springer, Switzerland 42-45.
- George, E. F. M. A. H., & G. J. D. Klerk. (2008). The Components of Plant Tissue Culture Media II: Organic Additions, Osmotic and pH Effects, and Support Systems. *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Editions*: 115-173.
- Gurav, S. S., Nilambari, S. G., Arun, T. P., and Nandkishore, J. D. 2019. Effect of Explant Source, Culture Media, and Growth Regulators on Callogenesis and Expression of Secondary Metabolites of *Curcuma Longa*. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 26 (2): 172-190.
- Gunawan, L. W. 1992. *Teknik Kultur Jaringan Tanaman*. Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman PAU Bioteknologi IPB, Bogor.
- Habibah, N. A. (2009). *Efektivitas Penambahan Elisitor Asam Jasmonik dalam Peningkatan Sintesis Senyawa Bioaktif Andrografolid pada Kultur Suspensi Sel Sambiloto (Effectiveness of Jasmonic Acid Elicitor Addition for Andrographolide Synthesis Induction of Sambiloto Culture) NOOR AINI HABIBAH. 1*, 11–18.
- Hafsan. 2014. *Mikrobiologi Analitik*. Alaudin University Press, Makassar.
- Hakim, A. R., & Saputri, R. (2020). Narrative Review: Optimasi Etanol sebagai Pelarut Senyawa Flavonoid dan Fenolik. *Jurnal Surya Medika*, 6(1), 177–180. <https://doi.org/10.33084/jsm.v6i1.1641>
- Halder, M., Sayantika, S., and Sumita, J. 2019. Elicitation: A biotechnological tool for enhanced production of secondary metabolites in hairy root cultures. *Engineering in life sciences*, 19 (12): 880-895.
- Handayani, P. A., & Nurcahyanti, H. (2015). Ekstraksi Minyak Atsiri Daun Zodia (*Evodia Suaveolens*) Dengan Metode Maserasi dan Distilasi Air. *Jbat*, 4(1), 1–7. <https://doi.org/10.15294/jbat.v3i1.3095>
- Handayani, S. R., Maisura., dan Astia, R. 2017. Pengaruh Letak Posisi Eksplan dan Sitokinin Pada Perkecambahan. *Jurnal Agrium* 14 (2) : 1-8.
- Hanin, N. N. F., dan Pratiwi, R. 2017. Kandungan Fenolik, Flavonoid dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Paku Laut (*Acrostichum aureum* L.) Fertil dan Steril. *Journal of Tropical Biodiversity and Biotechnology*, 2 (2): 51-56.
- Hardianto, A. S., & Wijayani, A. (1994). Pengaruh Variasi Konsentrasi Asam Naftalen Asetat Terhadap Pertumbuhan dan Kandungan Flavonoid Kalus Daun Dewa [*Gynura procumbens* (LOUR) Merr.]. *Biofarmasi*, 2(2): 69-74.

- Haris, M. 2011. Penentuan Kadar Flavonoid Total dan Aktivitas Antioksidan dari Daun Dewa (*Gynura pseudochina* (Lour) DC) dengan Spektrofotometer UV-Visibel. *Skripsi*. Universitas Andalas, Padang.
- Hassan, B. A. R. 2012. Medicinal Plants (Importance and Used). *Pharmaceut Anal Acta*, 3 (10): 1000-1139.
- Hasyim, M., Bushra, A., Samantha, D., Christope, H., Bilal, H. B., and Sumaira, A. 2021. Comparative Effects of Different Light Sources on the Production of Key Secondary Metabolites in Plants in Vitro Cultures. *Plants*, 10 (8): 1-18.
- Heinisch, M., José J., and Dan, M. 2019. Current Experience with Application of Metal-based Nanofertilizers. *MATEC Web of Conferences*, 290 (03006): 1-7.
- Ikeuchi, M., Keiko, S., dan Akira, I. 2013. Plant Callus: Mechanisms of Induction and Repression. *The Plant Cell*, 25 (9): 3159-3173.
- Indah, P. N., dan Ermavitalini, D. (2013). Induksi Kalus dan Daun Nyamplung (*Calophyllum inophyllum* Linn.) Pada Beberapa Kombinasi Konsentrasi 6-Benzylaminopurine (BAP) dan 2,4-Dichlorophenoxyacetic (2,4-D). *Jurnal Sains dan Semi Pomits*, 2(1): 1-6.
- Indarto, I., Narulita, W., Anggoro, B. S., & Novitasari, A. (2019). Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Binahong Terhadap Propionibacterium Acnes. *Biosfer: Jurnal Tadris Biologi*, 10(1), 67–78. <https://doi.org/10.24042/biosfer.v10i1.4102>
- Indrasari, S. 2020. Pengaruh Ekstrak Etanol Daun Kembang Bulan (*Tithonia diversifolia*) Terhadap Kadar Serum Kreatinin Pada Tikus Galur Wistar yang Diinduksi Diabetes Melitus dengan Streptozotocin. *Skripsi*. Fakultas Kedokteran, Universitas Islam Indonesia, Yogyakarta.
- Induksi, T., Jarak, K., Jatropha, P., Studi, P., & Agronomi, J. (2010). *Skripsi*. 1–40.
- J., Sofiana, D. A., Wulan Manuhara, Y. S., & . S. (2018). Induksi Kalus Piper retrofractum Vahl. dengan Zat Pengatur Tumbuh Auksin dan Sitokinin. *Journal of Pharmacy and Science*, 3(2), 41–46. <https://doi.org/10.53342/pharmasci.v3i2.116>
- Jama, B., Palm, C. A., Buresh, R. J., Niang, A., Gachengo, C., Nziguheba, G., and Amadalo. 2000. *Tithonia diversifolia* as a green manure for soil fertility improvement in western Kenya: A review. *Agroforestry Systems*, 49 (2): 201-221.
- Jannah, R. (2016). *Pengaruh pemberian elisitor Cu²⁺ terhadap kalus Artemisia vulgaris dalam upaya penyediaan artemisinin sebagai antimalaria*. 2(2010), 155–158. <https://doi.org/10.13057/psnmbi/m020206>

- Kaewseejan, N., Vallaya, S., dan Sirithon, S. 2015. Potential of Leaves as Source of Flavonoid-Enriched Fractions With Enhanced Antioxidant Capacity. *Journal of Function Food*, 12(1): 120-128.
- Khadijah. Ahmad, M. J., Sudir, u., dan Iin, S. 2017. Penentuan Total Fenolik dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanolik Daunsamama (*Anthocephalus macrophyllus*) Asal Ternate, Maluku Utara. *Jurnal Kimia Mulawarman*, 15 (11): 11-18.
- Khan, T., Thariq, K., Christophe, H., Bilal, H. A. 2019. Effect of Chitosan and Salicylic Acid on the Production of Pharmacologically Attractive Secondary Metabolites in Callus Cultures of *Fagonia indica*. *Industrial Crops & Products*, 129: 525-535.
- Ku, Y. S., Carolina, A. C., Ming, S. N., Jeongjun, Y., Gyuhwa, Y., dan Hon, M. L. 2020. The Effect of Domestication on Secondary Metabolite Composition in Legumes. *Frontiers in Genetics*, 11: 1-20.
- Kumar, P., Sonal, S., Madhu, K., dan Hanumantharao, G. R. 2013. Effect Of Quercetin on Lipid Peroxidation And Changes in Lung Morphology in Experimental Influenza Virus Infectio. *International Journal of Experimental Pathology*, 84 (3): 127-134.
- Kurnianingsih, N., Mursal, G., Siti, R., dan Aida, M. 2020. Pelatihan Teknik Dasar Kultur Jaringan Tumbuhan. *Jurnal Masyarakat Mandiri*, 4 (5): 888-896.
- Kurniasari, H., Andi, J. N. H., Uly, W. R. U., dan Tumpal, M. 2022. Profil Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan Uji Aktivitas Antifungi Ekstrak n-Heksan Herba Kembang Bulan (*Tithonia diversifolia* (Hemsl.) Gray) Terhadap *Candida albicans* dan *Microsporum canis*. *Herbal Medicine Journal*, 5 (1): 33-37.
- Kusbiantoro, D., dan Purwaningrum, Y. 2018. Pemanfaatan kandungan metabolit sekunder pada tanaman kunyit dalam mendukung peningkatan pendapatan masyarakat. *Jurnal Kultivasi*, 17 (1): 544-549.
- Ladeska, V., Ema, D., Deviana, I. S. 2019. Pharmacognostical Studies and Determination of Total Flavonoids of Paitan (*Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray. *Journal Pharmacogn*, 11 (6): 1256-1261.
- Laila, F. N. (2014). Produksi Metabolit Sekunder Steviosida Pada Kultur Kalus Stevia (*Stevia Rebaudiana* Bert. M.) Dengan Penambahan Zpt 2,4-D Dan Peg (Polyethylene Glykol) 6000 Pada Media MS (Murashige & Skoog). *El-Hayah*, 4(2), 57. <https://doi.org/10.18860/elha.v4i2.2627>

- Leal, C. A. E., Cesar, A. P. G., and Silverio, G. L. 2018. In vitro plant tissue culture: means for production of biological active compounds. *Planta*, 248 (1): 1-18.
- Lestari, S. A. D. 2016. Pemanfaatan Paitan (*Tithonia diversifolia*) sebagai Pupuk Organik pada Tanaman Kedelai. *Iptek Tanaman Pangan*, 11 (1): 49-56.
- Lopes, C. L., Maria, F. C., Cecilia, J. L., Antia, G. P. Paula, G. O. Maria, C., Miguel, A. P., dan Jesus, S. G. 2020. Metabolites from Macroalgae and Its Applications in the Cosmetic Industry: A Circular Economy Approach. *Resources*, 9 (101): 1-30.
- Lubis, B., Ika, N. S., Rony, A., Sri, M. B. B., Chandra, P., Novandi, P., and Nur, U. M. B. T. 2019. Anti-inflammatory Activity Test for Ethanol Extract Moon Flower (*Tithonia diversifolia*) Leaves to Male White Mice. *ICHIMAT*, ISBN: 978-989-758-460-2: 551-557.
- Lumbessy, M., Jemmy, A., dan Jessy, J. E. P. 2013. Uji Total Flavonoid Pada Beberapa Tanaman Obat Tradisional di Desa Waitina Kecamatan Mangoli Timur Kabupaten Kepulauan Sula Provinsi Maluku Utara. *Jurnal MIPA UNSRAT Online*, 2 (1): 50-55.
- Maftuchah, A. H. K., & Joko, B. S. (1998). Induksi Kalus *Artemisia (Artemisia Vulgaris L.)* Melalui Kultur *In Vitro*. *Tropika*, 6(2): 135-141.
- Mahmudah, Z. (2018). Pengaruh Kombinasi Zat Pengatur Tumbuh Auksin (IAA dan 2,4-D) dan Sitokinin(BAP) Terhadap Induksi Kalus dan Kandungan Flavonoid Tanaman Iler (*Plectrans scutellarioides*) Secara *In Vitro*. *Skripsi*, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Sunan Ampel Surabaya, Surabaya.
- Manuhara, Y. S. W. 2001. Regenerasi Tanaman Sawi (*Brassica juncea L. var Morakot.*) Melalui Teknik Kultur Jaringan. *Jurnal MIPA Universitas Airlangga*, 6(2): 127-130
- Mazon, A. M., Ricardo, B. H. A., Karla, O. N. C., Andriana, O. H., dan Karina, M. M. 2019. Toxicity of Secondary Metabolites. *Physical Sciences Reviews*, 4 (12): 1-11.
- Mendoza, N., dan Eleazar, M. E. S. 2018. Introduction to Phytochemicals: Secondary Metabolites from Plants with Active Principles for Pharmacological Importance. *Phytochemicals*, 25: 25-47.
- Megawati. Sofa, F., Lia M., Edi, S., dan Galuh, W. 2021. Kandungan Fenolik dan Flavonoid Total Daun *Macaranga hispida* (Blume) Mull. Arg sebagai Kandidat Obat Antidiabetes. *Jurnal Kefarmasian Indonesia*, 11(1): 1-7.

- Mierziak, J., Kostyn, K., Kulma, A., 2014. Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment. *Mol. Basel Switz.* 19 (10): 16240–16265.
- Mubarokah, N. R. (2015). Respon Beberapa Varietas Tanaman Mentimun (*Cucumis sativus* L.) terhadap Cekaman Logam Berat Cu (Tembaga). *Tugas Akhir. Jurusan Biologi. Institut Teknologi Sepuluh November. Surabaya.*
- Nagendran Balasundram, N., Kalyana, S., dan Samir, S. 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99 (1): 191–203.
- Niken Ariati, S., Waeniati, Muslimin, & Suwastika, I. 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), 74–84.
- Nikzad, N., dan Hadi, P. 2021. Evaluation of the effect of Organic Pollutants Exposure on the Antioxidant Activity, Total Phenolic and Total Flavonoid Content of Lettuce (*Lactuca sativa* L.) Using UV–Vis Spectrophotometry and Chemometrics. *Microchemical Journal*, 170 : 1-11.
- Nilamsari, D. D., & Rachmadiarti, F. (2019). Kemampuan *Azolla microphylla* dalam Menyerap Logam Berat Tembaga (cu) pada Konsentrasi yang Berbeda. *LenteraBio*, 8(3), 207–212.
- Ningsih, I. Y. 2014. Pengaruh Elisitor Biotik dan Abiotik Pada Produksi Flavonoid Melalui Kultur Jaringan Tanaman. *PHARMACY*, 11 (2): 1-16.
- Nurchayati, Y. 2017. Penyerapan Dan Akumulasi Tembaga (Cu^{2+}) Pada Kultur *Datura metel* L. In Vitro Serta Pengaruhnya Pada Profil Metabolit. *Disertasi*. Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Odeyemi, A. T., Agidigbi, T. S., Adefemi S. O., dan SO Fasuan, S. O. 2014. Antibacterial Activities of Crude Extracts Of *Tithonia Diversifolia* Against Common Environmental Pathogenic Bacteria. *The Experiment*, 20 (4): 1421-1426.
- Oseni, O. M., Veena, P., and Tapan, K. N. 2018. A Review on Plant Tissue Culture, a Technique for Propagation and Conservation of Endangered Plant Species. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7 (7): 3778-3786.
- Panda, S. K., dan Walter, L. 2018. Antiparasitic Activity in Asteraceae With Special Attention to Ethnobotanical Use by Tribes of Odisha, India. *Parasite*, 25 (10): 1-25.

- Pandiangan, D. (n.d.). *Peningkatan Produksi Katarantin Melalui Teknik Elisitasi Pada Kultur Agregat Sel Catharanthus Roseus The Enhancement Of Catharanthine Production By Elicitation Technic On Catharanthus Roseus Cell Aggregates.*
- Paula, D. A. C., Rejane, B. O., Bruno, A. R., and Fernando, B. D. C. 2012. Ethnobotany, Chemistry, and Biological Activities of the Genus Tithonia (Asteraceae). *Chemistry & Biodiversity*, 9 (2): 210-235.
- Parubak, A. S. 2013. Senyawa Flavonoid Yang Bersifat Antibakteri Dari Akway (*Drimys beccariana*.Gibbs). *Chem. Prog.*, 6 (1): 34-37.
- Pratiwi, A., Manurung, A. F., & Sumitra, J. (2020). Penetapan Kadar Vitamin C Pada Kulit Pisang (*Musa Paradisiaca*) Dengan Metode Spektrofotometri Uv-Visible Tahun 2018. *Jurnal Farmasimed (Jfm)*, 2(2), 56–62. <https://doi.org/10.35451/Jfm.V2i2.363>
- Pretti, I. R., Anny, G. D. L., Claudia, M. J., and Maria, D. C. P. B. 2018. Variation of biochemical and antioxidant activity with respect to the phenological stage of *Tithonia diversifolia* Hemsl. (Asteraceae) populations. *Industrial Crops & Products*, 121: 241-249.
- Purwaningsih, W. R. K., & Y. Linda. (2007). Anatomi Kalus dan Berasal Dari Eksplan Daun *Catharanthus roseous* (L.) G. Don (Tapak Dara). *Jurnal Seminar Nasional Bioteknologi*.
- Puspha, S.A., Goonetilkhe, P., and Billingham, N.C., 1995, *Rubber Chemistry & Technology*, 68 (5): 705-716.
- Radman, R., Teresa S., Christopher B., and Tajalli K. 2003. Elicitation of plants and microbial cell systems. *Biotechnology and applied biochemistry*, 37 (1): 91-102.
- Raei, M., S. Abdullah, A., M. Omidi., dan M. Khodayari. 2014. Effect of Abiotic Elicitors on Tissue Culture of *Aloe vera*. *Internasional Journal of Biosciences*, 5 (1): 74-81.
- Rahayu, M. P., & Lucia, V. I. (2015). Penetapan Kadar Fenol Total Ekstrak Etil Asetat dan Fraksi Dichloromethan-Etil Asetat Kulit Batang Mundu (*Garcinia dulcis*. Kurz). *Biomedika*, 8(2): 37-44.
- Rahman, N., Hani, F., Nurhaidar, R., dan Hartati, N. S. 2021. Pengaruh Berbagai Zat Pengatur Tumbuh Terhadap Induksi Kalus Organogenetik dari Ubi Kayu (*Manihot esculenta* Crantz) Genotip Gajah dan Kuning. *Jurnal Ilmu Dasar*, 22 (2): 119-126.

- Rahman, N. F., Nursamsiar., Megawati., Handayani., dan Christa, A. M. S. 2021. Total Phenolic and Flavonoid Contents and Antioxidant Activity of Kembang Bulan Leaves (*Tithonia diversifolia* (Hemsley) A. Gray). *IJPST*, 1 (1): 57-65.
- Ramadhani, M. A., Anita K. H., Novel, F. L., dan Armin, H. J. 2020. Skrining Fitokimia Dan Penetapan Kadar Flavonoid Total Serta Fenolik Total Ekstrak Daun Insulin (*Tithonia diversifolia*) Dengan Maserasi Menggunakan Pelarut Etanol 96 %. *Indonesian Journal of Pharmacy and Natural Product*, 3 (1): 8-18.
- Randhir, R., Yuan-Tong, L., dan Kalidas, S. 2004. Phenolics, their antioxidant and antimicrobial activity in dark germinated fenugreek sprouts in response to peptide and phytochemical elicitors. *Asia Pac J Clin Nutr*, 13 (3): 295-307.
- Rasud, Y., & Bustaman, B. (2020). In Vitro Callus Induction from Clove (*Syzygium aromaticum* L.) Leaves on Medium Containing Various Auxin Concentrations. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*, 25(1), 67–72. <https://doi.org/10.18343/jipi.25.1.67>
- Ratnasari, B. D., Suminar, E., Nuraini, A., & Ismail, A. (2016). Pengujian efektivitas berbagai jenis dan konsentrasi sitokinin terhadap multiplikasi tunas mikro pisang (*Musa paradisiaca* L.) secara In Vitro. *Kultivasi*, 15 (2): 74-80.
- Redha, A. 2020. Flavonoid: Struktur, Sifat Antioksidatif Dan Peranannya Dalam Sistem Biologis. *Jurnal Belian*, 9 (2): 196-202.
- Retnaningati, D., Hermanto., Ekawati, P., dan Hartini, R. L. S. 2021. Pertumbuhan Kalus dan Produksi Katekin Kultur *In Vitro* Kalus The (*Camelia sinensis* L.) dengan Penambahan Elisitor Ca^{2+} dan Cu^{2+} . *Jurnal Ilmiah Ilmu-Ilmu Hayati*, 6 (3): 192-202.
- Rivai, R. R & H Helmanto. 2015. Induksi kalus *Chrysanthemum indicum* untuk meningkatkan keragaman genetik dari sel somatik. *Pros Sem. Nas Masy Biodiv Indon*, 1 (1): 167-170.
- Robinson, T. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. Edisi ke-4. Terjemahan Kosasih Padmawinata. ITB Press, Bandung.
- Rohman, F., Yusri, J., Sulisetijono., Dwiyono, H. U., Purwanto., Sri, R. L., Siti, N. A., and Wira, E. P. 2019. Plants diversity as a medicinal plants by the Tengger Tribe, Bromo Tengger Semeru National Park, East Java, Indonesia. *EurAsia Journal of BioSciences*, 13 (2) : 2293-2298.

- Rissa Laila Vifta, Muhammad Alviyan Shutiwawan, Alif Maulidya, & Richa Yuswantina. (2021). Skrining Flavonoid Ekstrak Buah Parijoto (*Medinilla Speciosa* Blume) Asal Kabupaten Kudus Dan Semarang Dengan Pembanding Kuersetin Dan Rutin. *Media Informasi Penelitian Kabupaten Semarang*, 4(1), 3–13. <https://doi.org/10.55606/sinov.v4i1.57>
- Sahin, G., Sandeep, K. V., Ekrem, G. 2017. Investigation of Relationship Between Chemical Stress Factors and Certain Metabolites Including Cardenolides in Callus Cultures of Endemic Turkish *Digitalis* L. Species. *International Journal of Secondary Metabolite*, 4 (3): 27-36.
- Samanhudi. Amalia T, S., Edi, P., dan Indah. T. R. 2021. Multiplikasi *Aquilaria malaccensis* dengan NAA dan Ragi Pada Kultur *In Vitro*. *Jurnal Pemuliaan Tanaman Hutan*, 15 (1): 47-54.
- Sánchez, S., M. Eugenia, M. I., dan Francisco, E. 2000. Biomass production and biochemical variability of the marine microalga *Isochrysis galbana* in relation to culture medium. *Biochemical Engineering Journal*, 6 (1): 13–18
- Sasmita, F. W., Eko, S., Husamah. dan Yuni, P. 2017. Efek Ekstrak Daun Kembang Bulan (*Tithonia diversifolia*) Terhadap Kadar Glukosa Darah Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi Alloxan. *Biosfera*, 34 (1): 22-31.
- Satria, M. T., Neliyati, & Jasminarni. (2019). Pengaruh Zat Pengatur Tumbuh 2,4-D (Dichlorophenoxyacetid- Acid) dan Kinetin Terhadap Induksi Kalus dari Eksplan Daun Kayu Manis (*Cinnamomun Burmanii*). *Jurnal Agroecotania*, 2(1), 39–40. <https://online-journal.unja.ac.id/Agroecotania/article/view/7901>
- Saptiani, E., Hayatul, R., dan Muharam. 2021. Induksi Kalus Dari Eksplan Daun Tanaman Kawista (*Limonia acidissima* L.) Secara *in Vitro* Pada Media MS Dengan Penambahan Beberapa Konsentrasi Air Kelapa (*Cocos nucifera* L.). *Jurnal Agrotek Indonesia* 2 (5): 51-56.
- Senkal, B. C. 2020. The Role of Secondary Metabolites Obtained from Medicinal and Aromatic Plants in Our Lives. *ISPEC Journal of Agr. Sciences*, 4 (4): 1071-1079.
- Setiawati, T., Alma, A., Mohamad, N., Valentina, A. K., dan Ichsan, B. 2020. Analisis Metabolit Sekunder Kultur Pucuk, Kalus, dan Tanaman Lapang *Chrysanthemum morifolium* Ramat. *Jurnal Ilmu Dasar*, 21 (1): 1-10.

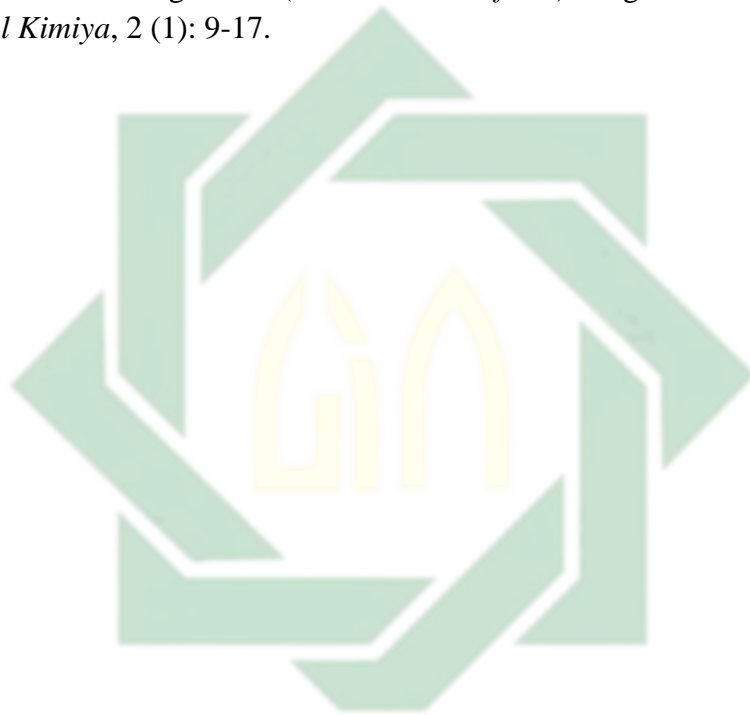
- Satria, M. T., Neliyati, & Jasminarni. (2019). Pengaruh Zat Pengatur Tumbuh 2,4-D (Dichlorophenoxyacetid- Acid) dan Kinetin Terhadap Induksi Kalus dari Eksplan Daun Kayu Manis (Cinnamomun Burmanii). *Jurnal Agroecotania*, 2(1), 39–40. <https://online-journal.unja.ac.id/Agroecotania/article/view/7901>
- Shaon, M. T. W., Nurul A., Sabbir, H. S., and Deloara B. 2020. Comparative Effects of Copper Sulfate And Zinc Sulfate On Performances Of Broiler Chickens. *Research in Agriculture Livestock and Fisheries*, 7 (3): 465-474.
- Sharmaa, M., Ashok A., Rajinder, G., and Sharada, M. 2015. Enhanced bacoside production in shoot cultures of *Bacopa monnieri* under the influence of abiotic elicitors. *Natural product research*, 29 (8):745-749.
- Silvina, F., Isnaini, I., & Ningsih, W. (2022). Induksi kalus daun binahong merah (*Basella rubra* L.) dengan pe,berian 2,4-D dan kinetin. *Jurnal Agro*, 8(2), 274–286. <https://doi.org/10.15575/14273>
- Sitompul, S. M., & Guritno, B. (1995). *Analisi Pertumbuhan Tanaman*. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- Solfaine, R., Hamid, I. S., dan Muniroh, L. 2021. Antioxidative Activity of *Tithonia Diversifolia* Extract in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *International Conference on Bioscience and Biotechnology*, 913 (1): 1-7.
- Sree, V. N., Udayasari, P. V. V., Aswani, K. Y., Ravi, B. B., Phani, K. Y., dan Vijay, V. M. 2010. Advancements in the Production of Secondary Metabolites. *Journal of Natural Products*, 3 (1): 112-123.
- Surahmaida, S., & Umarudin, U. (2019). Studi Fitokimia Ekstrak Daun Kemangi Dan Daun Kumis Kucing Menggunakan Pelarut Metanol. *Indonesian Chemistry and Application Journal*, 3(1), 1. <https://doi.org/10.26740/icaj.v3n1.p1-6>
- Suryani, R., dan Mya, N. S. 2019. Penggunaan Media Tanamn dan Pupuk Organik Cair Pada Tahap Aklimatisasi Terhadap Pertumbuhan Bibit Anggrek Bulan (*Phalaenopsis amabilis*) Hasil Kultur Jaringan. *Jurnal Agroqua*, 17 (1): 67-75.
- Syabana, M. A., Marianingsih, P., Hermita, N., Rohimah, I., Jurusan, D., Faperta Untirta, A., Biologi, P., Untirta, F., Alumni,), Agroekoteknologi, J., & Untirta, F. (2017). Induksi Dan Pertumbuhan Kalus Tanaman Stevia (*Stevia Rebaudiana Bertoni* M.) Dengan Perbedaan Konsentrasi Peg (Polyethylene Glycol) Pada Kondisi Pencahayaan Secara In Vitro In Vitro Callus Induction and Growth of Stevia (*Stevia rebaudiana Bertoni* M.) with Difference Concentrations of PEG (Polyethylene Glycol) and Light Conditions. *Biodidaktika*, 12(2), 57–68.

- Szczykutowicz, M. K., Micha, D., Ivical, B., Azra, D., Anna, A., Halina, E., dan Agnieszka, S. 2022. Impacts of Elicitors on Metabolite Production and on Antioxidant Potential and Tyrosinase Inhibition in Watercress Microshoot Cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106 (2): 619-633.
- Tahir, I., Karna, W., dan Dinni, W. 2003. Terapan Analisis Hansch untuk Aktivitas Antioksidan Senyawa Turunan Flavon/Flavonon. *Prosiding Seminar Rheometri*, Fakultas FMIPA, Yogyakarta.
- Tehubijuluw, H., Watuguly, T., & Tuapattinaya, P. M. . (2019). Analisis Kadar Flavonoid Pada Teh Daun Lamun (*Enhalus Acoroides*) Berdasarkan Tingkat Ketuaan Daun. *Biopendix: Jurnal Biologi, Pendidikan Dan Terapan*, 5(1), 1–7. <https://doi.org/10.30598/biopendixvol5issue1page1-7>
- Thakur, S., Sujata, B., Prem, K. K., and Sunil, P. 2019. Improving production of plant secondary metabolites through biotic and abiotic elicitation. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 12: 1–12.
- Tian-yang., Wang Qing Li., Kai-shun Bi. (2018). Bioactiv flavonoids In Medicinal Plants: Structure, Activity and Biological Fateasian. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13 (1): 12–23.
- Tjitrosoepomo, G. 1988. *Taksonomi Tumbuhan (Spermathopyta)*. Yogyakarta: Gajah Mada University Press.
- Tona, L., Kambu, K., Ngimbi, N., Mesia, K., Penge, O., Lusakibanza, M., Cimanga, K., Brunye, T. D., Apers, S., Totte, J., and Vietinck, A. J. 2000. Antiamoebic and spasmolytic activities of extracts from some antidiarrhoeal traditional preparations used in Kinshasa, Congo. *Phitomedicine*, 7 (1): 31-38.
- Ulva, M., Nurchayati, Y., Prihastanti, E., & Setiari, N. (2011). Pertumbuhan Kalus Tomat (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Varietas Permata F1 dari Jenis Eksplan dan Konsentrasi Sukrosa yang Berbeda secara In Vitro. *Life Science*, 8(3), 160–169.
- Verawati. Mimi, A., dan Novicaresa, M. 2011. Aktivitas Anti Inflamasi Ekstrak Etanol daun Kembang Bulan (*Tithonia diversifolia*. A. Gray) Terhadap Mencit Putih Betina. *SCIENITA*, 1 (1): 47-52.
- Verpoorte, R., Heijden, R. V. D., Hoopen, H. J. G., dan Memelink, J. 1999. Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolite Pathways for TheProduction of Fine Chemicals. *Biotechnology Letters*, 21 (6): 467-479.

- Vifta, R. S., Muhammad, A. S., Alif, M., & Richa, Y. (2021). Skrining Flavonoid Ekstrak Buah Parijoto (*Medinilla speciosa* Blume) Asal Kabupaten Kudus dan Semarang dengan Pembanding Kuersetin dan Rutin. *SINOV*, 4(1): 3-13.
- Wahyuningrum, M. R., dan Probosari, E. 2012. Pengaruh Pemberian Buah Pepaya (*Carica papaya* L.) Terhadap Kadar Trigliserida Pada Tikus Sprague Dawley dengan Hiperkolesterolemia. *Journal of Nutrition College*, 1 (1): 192-198.
- Wardani, D. P., Solichatun., & A. D. Setyawan. (2004). Pertumbuhan dan Produksi Saponin Kultur Kalus *Talium paniculatum* Gaertn. Pada Variasi Penambahan Asam 2,4-Diklorofenoksi Asetat dan Kinetin. *Biofarmasi*, 2(1): 35-43.
- Wardani, Y. K., Elizabeth, B. E. K., dan Suchahyo. 2020. Korelasi Antara Aktivitas Antioksidan dengan Kandungan Senyawa Fenolik dan Lokasi Tumbuh Tanaman *Celosia argentea* Linn. *Bioma*, 22 (2): 136-142.
- Wattimena, G. A. (2006). Kecenderungan Marginalisasi Peran Kultur Jaringan Dalam Pemulihan Tanaman. *Prossiding Seminar Nasional Bioteknologi dan Pemulihan Tanaman*, Bogor.
- Widyaningrum, R. 2019. Pemanfaatan Daun Paitan (*Tithonia diversifolia*) dan Daun Lamtoro (*Leucaena leucocephala*) Sebagai Pupuk Organik Cair (POC). *Skripsi*. Fakultas Tarbiyah dan Keguruan, Universitas Islam Negeri Raden Intan, Lampung.
- Yang, L., Kui, S. W., Xiao, R., Ying, X. Z., Feng, W., dan Qiang, W. 2018. Response of Plant Secondary Metabolites to Enviromental Factors. *Molecules*, 23 (4): 1-26.
- Yao, L. H., Jiang, Y. M., Shi, J., Thomas-Barberan, F. A., Datta, N., Singanusong, R., dan Chen, S. S. 2004. Flavonoids in Food and Their Health Benefits. *Plant Foods for Human Nutrition*, 59 (3): 113-122.
- Yazid, F., Shania, O. S., Faizal, D. R., Rosmalena, R., Andini, S., dan Vivitri, D. P. 2021. Antidiabetic Effect of *Tithonia diversifolia* and *Malus domestica* Leaf Extract in Alloxan-Induced Sprague Dawley Rats. *Sys Rev Pharm*, 12 (1): 1630-1638.
- Zakaria, D. 2010. Pengaruh Konsentrasi Sukrosa dan BAP (*Benzil Amino Purine*) Dalam Media Murashige Skoog (Ms) Terhadap Pertumbuhan dan Kandungan Reserpin Kalus Pule Pandak (*Rauvolfia verticillata* Lour.). *Skripsi*. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sebelas Maret, Surakarta.

Zarad, M. M., Toaima, N. M., Refaey, K. A., Atta, R. F., and Elateeq, A. A. 2021. Copper sulfate and Cobalt chloride induced total phenolics accumulation and antioxidant activity of *Artemisia annua* L. callus cultures. *Al-Azhar Journal of Agricultural Research* V, 46 (2): 50-64.

Zirconia, A., Nunung, K., dan Vina, A. 2015. Identifikasi Senyawa Flavonoid dari Daun Kembang Bulan (*Tithonia diversifolia*) dengan Metode Pereaksi Geser. *Al Kimiya*, 2 (1): 9-17.



UIN SUNAN AMPEL
S U R A B A Y A