

**PENGARUH SUKROSA TERHADAP PERTUMBUHAN DAN
PRODUKSI FLAVONOID DAN FENOLIK TOTAL KULTUR
KALUS TANAMAN PAITAN (*Tithonia diversifolia*)**

SKRIPSI



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

**OLEH:
ACHMAD AINUR ROFIQ
H91219035**

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

**SURABAYA
2023**

PERNYATAAN KEASLIAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini,

Nama : Achmad Ainur Rofiq

NIM : H91219035

Program Studi : Biologi

Angkatan : 2019

Menyatakan bahwa saya tidak melakukan plagiat dalam penulisan skripsi saya yang berjudul: "PENGARUH SUKROSA TERHADAP PERTUMBUHAN DAN PRODUKSI FLAVONOID DAN FENOLIK TOTAL KULTUR KALUS TANAMAN PAITAN (*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, 06 Juli 2023

Yang menyatakan,



(Achmad Ainur Rofiq)

NIM. H91219035

HALAMAN PERSETUJUAN

SKRIPSI

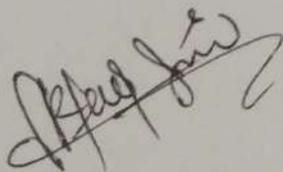
PENGARUH SUKROSA TERHADAP PERTUMBUHAN DAN PRODUKSI
FLAVONOID DAN FENOLIK TOTAL KULTUR KALUS TANAMAN *Tithonia*
diversifolia

Diajukan oleh
Achmad Ainur Rofiq
H91219035

Telah diperiksa dan disetujui untuk diujikan:

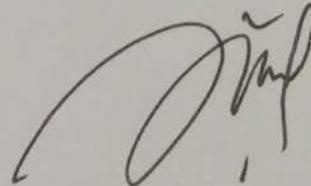
Telah diperiksa dan disetujui
Surabaya, 26 Juni 2023

Surabaya, 26/06/2023
Dosen Pembimbing I,



(Saiku Rokhim, M.KKK)
NIP. 198612212014031001

Surabaya, 26/06/2023
Dosen Pembimbing II,



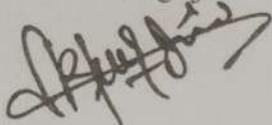
(Hanik Faizah, S.Si., M.Si.)
NUP. 201409019

LEMBAR PENGESAHAN

Skripsi Achmad Ainur Rofiq ini telah dipertahankan
di depan tim penguji skripsi
di Surabaya, 06 Juli 2023

Mengesahkan,
Dewan Penguji

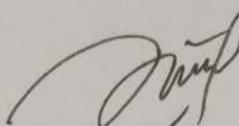
Penguji I



Saiku Rokhim, M.KKK

NIP. 198612212014031001

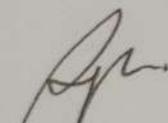
Penguji II



Hanik Faizah, M.Si.

NUP. 201409019

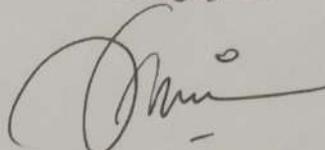
Penguji III



Risa Purnamasari, M.Si

NIP. 20140902

Penguji IV



Nirmala Fitria Firdhausi, M.Si

NIP. 198506252011012010

Mengetahui,

Dekan Fakultas Sains dan Teknologi

UIN Sunan Ampel Surabaya



De A Saepul Hamdani, M.Pd.

NIP. 196507312000031002



KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI SUNAN AMPEL SURABAYA
PERPUSTAKAAN

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

LEMBAR PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

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

Nama : Achmad Ainur Rofiq
NIM : H91219035
Fakultas/Jurusan : Sains dan Teknologi/Biologi
E-mail address : rafiinsankamil@gmail.com

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

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

PENGARUH SUKROSA TERHADAP PERTUMBUHAN DAN PRODUKSI FLAVONOID
DAN FENOLIK TOTAL KULTUR KALUS TANAMAN PAITAN (*Titbonia 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, 20 Juli 2023

Penulis

(Achmad Ainur Rofiq)

ABSTRAK

PENGARUH SUKROSA TERHADAP PERTUMBUHAN DAN PRODUKSI FLAVONOID DAN FENOLIK TOTAL KULTUR KALUS TANAMAN PAITAN (*Tithonia diversifolia*)

Tithonia diversifolia atau tanaman Paitan merupakan tanaman obat yang mempunyai aktivitas farmakologis seperti anti-inflamasi, antioksidan, dan antibakteri. Aktivitas tersebut berkaitan dengan kandungan fenolik dan flavonoid yang terdapat pada *Tithonia diversifolia*. Kultur jaringan menjadi salah satu alternatif dalam produksi metabolit sekunder dengan menambahkan konsentrasi sukrosa. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui pengaruh sukrosa terhadap pertumbuhan dan produksi flavonoid dan fenolik total kultur kalus tanaman *Tithonia diversifolia*. Penelitian ini menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 6 perlakuan yang dilakukan 5 kali ulangan. Eksplan yang digunakan yaitu bagian daun muda. Eksplan ditanam pada media MS, sukrosa 30 g/L, dan tambahan sukrosa dengan konsentrasi 30 g/L, 40 g/L, 50 g/L, 60 g/L, 70 g/L, 80g/L. Setelah 15 hari, dilakukan pemanenan dan pengamatan morfologi kalus, berat segar dan berat kering kalus, serta analisis kadar fenolik dan flavonoid dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Data hasil biomassa segar kalus, biomassa kering kalus dan kadar fenolik total dianalisis menggunakan uji *One Way Anova*, uji Kruskal Wallis dan uji Mann-Whitney. Hasil kadar flavonoid total dianalisis dengan uji *One Way Anova* dan uji *Duncan*, sedangkan data morfologi dianalisis secara deskriptif. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kalus yang dihasilkan berwarna hijauan, coklatan kegelapan seperti ungu dan merah dengan tekstur remah, intermediet dan kompak. Berat segar kalus didapatkan sebesar sebesar 2.88 ± 0.27 gr dan berat kering sebesar 0.257 ± 0.037 gr pada pemberian konsentrasi sukrosa 50 g/L. Pemberian konsentrasi sukrosa pada media produksi berpengaruh terhadap kadar fenolik dan flavonoid total ekstrak kalus tanaman Paitan, dimana kadar fenolik total tertinggi pada perlakuan pemberian sukrosa pada konsentrasi 50 g/L yaitu sebesar 6.56 ± 0.15 mg GAE/gr. Sedangkan kadar flavonoid total tertinggi pada perlakuan pemberian sukrosa pada konsentrasi 80 g/L yaitu 2.07 ± 0.07 mg QE/gr.

Kata Kunci: Sukrosa, Biomassa segar, Biomassa kering, fenolik, flavonoid

ABSTRACT

THE EFFECT OF SUCROSE ON THE GROWTH AND PRODUCTION OF FLAVONOIDS AND TOTAL PHENOLIC CALLUS CULTURE OF PAITAN (*Tithonia diversifolia*) Plants

Tithonia diversifolia or the Paitan plant is a medicinal plant that has pharmacological activities such as anti-inflammatory, antioxidant and antibacterial. This activity is related to the phenolic and flavonoid content found in *Tithonia diversifolia*. Tissue culture is an alternative in the production of secondary metabolites by adding sucrose concentrations. The purpose of this study was to determine the effect of sucrose on the growth and production of flavonoids and total phenolic callus culture of *Tithonia diversifolia* plants. This study used a completely randomized design (CRD) method with 6 treatments which were repeated 5 times. The explants used are the young leaves. The explants were grown in MS medium, 30 g/L sucrose, and additional sucrose at concentrations of 30 g/L, 40 g/L, 50 g/L, 60 g/L, 70 g/L, 80 g/L. After 15 days, harvesting and observation of callus morphology, fresh weight and dry weight of callus, as well as analysis of phenolic and flavonoid levels were carried out using a UV-Vis spectrophotometer. The yield data of fresh callus biomass, dry callus biomass and total phenolic content were analyzed using the One Way Anova test, Kruskal Wallis test and Mann-Whitney test. The results of total flavonoid levels were analyzed by One Way Anova test and Duncan's test, while morphological data were analyzed descriptively. The results showed that the callus produced was green in color, dark brown like purple and red with crumb, intermediate and compact textures. Fresh weight of callus was obtained at 2.88 ± 0.27 gr and dry weight at 0.257 ± 0.037 g at 50 g/L sucrose concentration. The concentration of sucrose in the production media affected the total phenolic and flavonoid levels of the callus extract of the Paitan plant, where the highest total phenolic content was in the treatment of sucrose administration at a concentration of 50 g/L, which was 6.56 ± 0.15 mg GAE/gr. While the highest total flavonoid content was in the treatment of sucrose at a concentration of 80 g/L, namely 2.07 ± 0.07 mg QE/gr.

Keywords: Sucrose, fresh biomass, dry biomass, phenolic, flavonoids

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadiran Allah SWT, atas berkah dan rahmat-Nya sehingga saya dapat menyelesaikan Skripsi ini. Penulisan Skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi tugas akhir Program Studi Biologi pada Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Sunan Ampel Surabaya. Saya menyadari bahwa, tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, dari masa perkuliahan sampai pada penyusunan Skripsi ini, sangatlah sulit bagi saya untuk dapat menyelesaikan Skripsi ini. Oleh karena itu, saya ucapkan terima kasih kepada:

- 1) Dr. Asep Saepul Hamdani, M.Pd selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi UIN Sunan Ampel Surabaya.
- 2) Asri Sawiji, MT selaku Ketua Jurusan Sains Fakultas Sains dan Teknologi UIN Sunan Ampel Surabaya.
- 3) Esti Tyastirin, M.KM selaku Ketua Prodi Biologi Fakultas Sains dan Teknologi UIN Sunan Ampel Surabaya.
- 4) Saiku Rokhim, M.KKK dan Hanik Faizah, M.Si., selaku dosen pembimbing yang telah menyediakan waktu, tenaga, dan pikiran untuk mengarahkan saya dalam penyusunan Seminar Proposal ini.
- 5) Risa Purnamasari, M.Si dan Nirmala Fitria Firdhausi, M.Si selaku dosen penguji skripsi ini.
- 6) Kedua orang tua dan keluarga yang telah memberikan bantuan dukungan material dan moral.
- 7) Semua rekan yang telah banyak membantu dalam pelaksanaan dan penyelesaian laporan ini.
- 8) Pihak-pihak yang telah membantu dalam penyelesaian proposal ini.

Akhir kata, saya berharap Tuhan Yang Maha Esa berkenan membalas segala kebaikan semuapihak yang telah membantu. Semoga Proposal ini membawa manfaat pada tataran praktis maupun pengembangan ilmu.

Surabaya, 6 Juli 2023

Achmad Ainur Rofiq

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSETUJUAN.....	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
PERNYATAAN KEASLIAN.....	iv
HALAMAN MOTTO	v
HALAMAN PERSEMBAHAN	vi
ABSTRAK.....	vii
ABSTRACT.....	viii
KATA PENGANTAR	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	10
1.3 Tujuan.....	10
1.4 Manfaat.....	10
1.5 Batasan Penelitian	11
1.6 Hipotesis.....	11
BAB II KAJIAN PUSTAKA	12
2.1 Paitan (<i>Tithonia diversifolia</i>).....	12
2.2 Kultur Jaringan	15
2.3 Induksi Kalus.....	16
2.4 Metabolit Sekunder.....	18
2.5 Sukrosa	24
2.6 Ekstraksi	25
2.7 Uji Kadar Fenolik Total.....	26
2.8 Uji Kadar Flavonoid Total.....	27
BAB III METODE PENELITIAN	29
3.1 Jenis penelitian	29
3.2 Waktu dan Tempat.....	30
3.3 Alat dan Bahan	31
3.4 Variabel Penelitian	31
3.5 Prosedur Penelitian.....	32
3.6 Analisis Data.....	42

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	44
4.1 Pengaruh Variasi Konsentrasi Sukrosa Terhadap Pertumbuhan Kalus Tanaman Paitan (<i>T. diversifolia</i>).....	44
4.2 Pengaruh Konsentrasi Sukrosa Terhadap Kadar Senyawa Metabolit Sekunder Tanaman Paitan (<i>T. diversifolia</i>)	59
BAB V PENUTUP.....	76
5.1 Kesimpulan.....	76
5.2 Saran.....	76
DAFTAR PUSTAKA	75
LAMPIRAN.....	85



UIN SUNAN AMPEL
S U R A B A Y A

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Tumbuhan paitan (<i>Tithonia diversifolia</i>)	10
Gambar 2.2 Kalus dari eksplan daun	14
Gambar 2.3 Struktur senyawa fenolik	16
Gambar 2.4 Biosintesis senyawa fenolik	18
Gambar 2.5 Struktur senyawa flavonoid	19
Gambar 2.6 Struktur senyawa turunan flavonoid	19
Gambar 2.7 Biosintesis senyawa flavonoid	20
Gambar 2.8 Struktur kimia sukrosa	21
Gambar 4.1 Kalus <i>T. diversifolia</i> pasca panen	40
Gambar 4.2 Kurva larutan standar fenolik pada panjang gelombang 760 nm	59
Gambar 4.3 Kurva larutan standar flavonoid pada panjang gelombang 760 nm	65



UIN SUNAN AMPEL
S U R A B A Y A

DAFTAR TABEL

Tabel 3.1 Rancangan penelitian	26
Tabel 3.2 Jadwal pelaksanaan penelitian	28
Tabel 4.1 Pengaruh pemberian sukrosa terhadap warna dan tekstur Kalus	45
Tabel 4.2 Hasil Pengaruh Konsentrasi Sukrosa Terhadap Biomassa segar kalus	51
Tabel 4.3 Hasil Uji Mann-Whitney parameter rata-rata berat kering total tanaman Paitan (<i>T. diversifolia</i>)	52
Tabel 4.4 Hasil Pengaruh Konsentrasi Sukrosa Terhadap Biomassa kering kalus	55
Tabel 4.5 Hasil Uji Mann-Whitney parameter rata-rata berat kering tanaman Paitan (<i>T. diversifolia</i>)	56
Tabel 4.6 Hasil Pengaruh Konsentrasi Sukrosa Terhadap Kadar Fenolik Total	60
Tabel 4.7 Hasil Uji Mann-Whitney parameter rata-rata kadar fenolik total tanaman Paitan (<i>T. diversifolia</i>)	60
Tabel 4.8 Hasil Pengaruh Konsentrasi Sukrosa Terhadap Konsentrasi dan Kadar Flavonoid total	65
Tabel 4.9 Hasil Uji Mann-Whitney parameter rata-rata kadar flavonoid total tanaman Paitan (<i>T. diversifolia</i>)	66

UIN SUNAN AMPEL
S U R A B A Y A

DAFTAR LAMPIRAN

- Lampiran 1 Murashige and Skoog
- Lampiran 2 Pembuatan media
- Lampiran 3 Perlakuan
- Lampiran 4 Hasil berat kalus dan metabolit sekunder
- Lampiran 5 Kadar fenolik total dan flavonoid total
- Lampiran 6 Uji Analisis berat basah
- Lampiran 7 Uji Analisis berat kering
- Lampiran 8 Uji Analisis kadar fenolik total
- Lampiran 9 Uji Analisis kadar flavonoid total



UIN SUNAN AMPEL
S U R A B A Y A

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan negara dengan hutan tropis yang luas dengan dua musim dalam setahun (Indrajaya *et al.*, 2022). Besarnya luas hutan di Indonesia membuat Indonesia memiliki banyak keanekaragaman tumbuhan, salah satunya yaitu tanaman herbalss yang tersebar di pulau-pulau besar seperti Sumatera, Jawa, dan Kalimantan, Sulawesi dan Maluku (Cahyaningsih *et al.*, 2021). Sejak dahulu nenek moyang masyarakat di Indonesia telah menggunakan tanaman sebagai obat-obatan karena mereka beranggapan bahwa tanaman merupakan bahan alami yang tidak menimbulkan efek samping dibandingkan dengan obat-obatan sintesis yang telah banyak beredar. Allah Subhanahu wata'ala telah menciptakan alam semesta ini beserta isinya penuh keteraturan dan ketetapan. Semua yang diciptakan bukanlah secara kebetulan, melainkan dengan benar. Segala ciptaan-Nya yang ada didunia ini memiliki manfaat dan tujuan, sebagaimana contohnya tanaman yang banyak dimanfaatkan oleh manusia sebagai bahan pangan, perabotan rumah tangga dan obat-obatan.

Firman Allah Subhanahu wata'ala dalam surah Ad-dukhan 44: 38-39:

وَمَا خَلَقْنَا السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضَ وَمَا بَيْنَهُمَا لِعَيْنٍ ۝ مَا خَلَقْنَاهُمَا إِلَّا بِالْحَقِّ وَلَكِنَّ أَكْثَرَهُمْ لَا

يَعْلَمُونَ ۝ مَا خَلَقْنَاهُمَا إِلَّا بِالْحَقِّ وَلَكِنَّ أَكْثَرَهُمْ لَا يَعْلَمُونَ ۝

Artinya: Tidaklah Kami ciptakan langit, bumi, dan apa yang ada di antara keduanya secara main-main. Tidaklah Kami ciptakan keduanya, kecuali dengan hak. Akan tetapi, kebanyakan dari mereka tidak mengetahui.

Firman Allah Subhanahu wata'ala dalam surah Asy-syuaraa 26: 7:

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمَا أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ ۝

Artinya: Apakah mereka tidak memperhatikan bumi, betapa banyak Kami telah menumbuhkan di sana segala jenis (tanaman) yang tumbuh baik?

Menurut tafsir Ibnu Katsir, Allah Ta'ala mengingatkan kebesaran kekuasaan-Nya dan keagungan kemampuan-Nya. Dialah yang Maha Perkasa, Maha Agung lagi Maha Kuasa yang telah menciptakan bumi dan menumbuhkan di dalamnya tumbuh-tumbuhan yang baik berupa tanaman-tanaman, buah-buahan dan juga hewan. Sehingga Ayat diatas menjelaskan bahwa Allah menciptakan tumbuhan yang baik-baik untuk dimanfaatkan salah satunya dimanfaatkan sebagai tumbuhan obat. Salah satu tumbuhan yang dapat dimanfaatkan adalah daun paitan (*Tithonia diversifolia*) (Abdullah, 2003).

Tithonia diversifolia merupakan tanaman liar invasif yang berasal dari negara Meksiko dan Amerika tengah yang disebarkan di daerah tropis dan sub tropis salah satunya di Indonesia (Kokou *et al.*, 2021). *T. diversifolia* merupakan tumbuhan perdu yang masuk kedalam keluarga Asteraceae yang tumbuh secara agresif dengan kemampuan hidup di berbagai kondisi tanah sehingga mudah dijumpai di berbagai daerah seperti di tepi jalan, sawah dan di tepi sungai (Agbede *et al.*, 2013).

Tanaman *T. diversifolia* memiliki khasiat bagi masyarakat sebagai obat-obatan herbal tradisional. *T. diversifolia* dikenal sebagai tanaman perdu yang memiliki khasiat sebagai obat herbal Abses di Venezuela, obat malaria hematoma dan nyeri otot di Meksiko, obat luka dan infeksi kulit di India, untuk obat diabetes

di Taiwan, obat malaria dan sebagai penangkal gigitan ular di Kenya dan obat malaria di Nigeria (Omokhua *et al.*, 2018). Berdasarkan hasil penelitian, *T. diversifolia* memiliki aktivitas dari sifat farmakologis seperti antioksidan, anti-diabetes, anti-malaria, anti-diare, anti-inflamasi dan anti-bakteri (Gama *et al.*, 2014; Afolayan *et al.*, 2016; Ojo *et al.*, 2018; (Solfaine *et al.*, 2021). Zhao *et al.*, (2012) menyatakan bahwa *T. diversifolia* dapat meningkatkan sensitivitas insulin dan meningkatkan kemampuan insulin. Ekstrak dari *T. diversifolia* juga dapat menghambat penyakit diabetes dengan menurunkan kadar gula darah (glukosa) pada penderita diabetes (Solfaine *et al.*, 2021).

Sifat farmakologis yang dimiliki pada tanaman *T. diversifolia* berhubungan dengan kandungan metabolit sekunder. Metabolit sekunder merupakan senyawa kimia turunan dari proses metabolisme tumbuhan, metabolit sekunder dibutuhkan tanaman untuk perlindungan tanaman dari gangguan dari luar namun tidak terlibat dengan perkembangan dan pertumbuhan tanaman (Zachariah and Leela, 2018). Tanaman *T. diversifolia* dikenal sebagai tanaman yang menghasilkan senyawa kimia (metabolit sekunder) seperti alkaloid, saponin, tannin, flavonoid dan fenolik (Ojo *et al.*, 2018; Omolola, 2019). Senyawa metabolit sekunder seperti isoflavonoid, terpen, alkaloid dan poliasitilen dapat berperan sebagai pertahanan tanaman dari hewan herbivora, dimana senyawa tersebut dapat membuat tanaman menghasilkan rasa pahit dan racun yang langsung muncul ketika tanaman tersebut dimakan oleh hewan herbivora (Bottger *et al.*, 2018).

Kandungan senyawa metabolit sekunder pada ekstrak daun *T. diversifolia* telah banyak diukur diberbagai penelitian, seperti pada penelitian yang dilakukan

oleh (Barboza *et al.*, 2018) dengan ditemukannya flavonoid sebanyak (3.220 ± 1.085) mg QE/g dan fenolik sebanyak (22.185 ± 0.201) mg GAE/g 1ml ekstrak daun kering *T. diversifolia*. Senyawa fenolik merupakan senyawa yang terkenal dengan antioksidannya dan sifat antimikrobanya. Senyawa fenolik bertanggung jawab untuk aktivitas pencegahan terhadap penyakit menular dan degeneratif, peradangan dan alergi melalui antioksidan serta antimikroba. Flavonoid adalah salah satu kelas senyawa fenolik. Dengan demikian, flavonoid memiliki banyak sifat obat dan fisiologis yang menguntungkan dan terbukti menunjukkan sifat antioksidan, anti-inflamasi, anti mutagenik dan anti-karsinogenik. Senyawa tersebut juga dikenal sebagai modulator fungsi enzim seluler utama dan penghambat potensial xantin oksidase, siklo-oksigenase, lipoksigenase dan fosfoinositida 3-kinase (Ang *et al.*, 2019)..

Kebutuhan metabolit sekunder dalam bidang industri sangatlah tinggi, hal ini dikarenakan metabolit sekunder yang banyak dimanfaatkan sebagai aromatik, bumbu masakan, pewarna makanan, parfum hingga obat-obatan yang membuat kebutuhan metabolit sekunder tanaman sangat dibutuhkan oleh industri-industri saat ini (John-Dewole, 2013). Senyawa fenolik dan flavonoid merupakan metabolit sekunder yang sering digunakan untuk keperluan industri farmasi sebagai obat-obatan dan industri lainnya. Senyawa fenolik memiliki manfaat dalam bidang industri, seperti pada industri makanan yang menggunakan antioksidan fenolik rumput laut telah diterapkan sebagai peningkat stabilitas oksidatif dan untuk meningkatkan kualitas intrinsik dan nilai gizi makanan. Ekstrak senyawa fenolik yaitu florotanin, juga dimanfaatkan dalam bidang

kosmetik, seperti produk perawatan kulit dan anti penuaan (Leandro *et al.*, 2020). Senyawa flavonoid alami dan turunannya juga dimanfaatkan dalam bidang industri yakni sebagai sumber molekul bioaktif yang bermanfaat untuk bahan baku obat-obatan herbal. Flavonoid dalam bidang industri juga berperan dalam berbagai aplikasi dalam industri makanan. Beberapa senyawa flavonoid telah banyak digunakan sebagai bahan pemanis atau pewarna makanan dan campuran bahan kimia (Tiwari, 2015; Brodowska, 2017).

Berdasarkan data ekspor dari tahun 2012 hingga 2022 yang diterbitkan oleh Badan Pusat Statistik, menunjukkan peningkatan grafik dalam bidang ekspor tanaman obat, aromatic dan rempah-rempah, dimana semua tanaman tersebut memiliki metabolit sekunder yang akan dimanfaatkan dalam bidang industri saat ini. Jumlah ekspor dari Indonesia ke negara tujuan mencapai 250.348,8ton pada tahun 2012 dan 294.688,1ton pada tahun 2021. Kebutuhan metabolit sekunder sebagai produk kesehatan juga meningkat semenjak adanya pandemi COVID-19, dimana masyarakat lebih memilih tanaman herbal atau produk herbal sebagai peningkat imun tubuh dan obat (Luković dan Nićiforović, 2021). Hal tersebut membuat kebutuhan senyawa metabolit sekunder tersebut menjadi lebih tinggi, oleh karena itu berbagai cara dilakukan untuk memperbanyak tanaman *T. diversifolia* dengan berbagai metode budidaya untuk mendapatkan senyawa fenolik dan flavonoid yang menjadi bahan baku produk farmasi.

Tithonia diversifolia dapat berkembang biak dengan biji (generatif) maupun stek batang (vegetatif). Perbanyak *T. diversifolia* yang lebih sering dilakukan oleh masyarakat yaitu dengan metode stek batang karena mudah dan pertumbuhan

tanaman lebih cepat (Galindo *et al.*, 2017). Namun metode stek batang dan biji memiliki kelemahan yaitu pertumbuhan tanaman tersebut bergantung terhadap lingkungannya seperti musim, suhu dan intensitas cahaya. Selain itu metode ini memiliki masa panen yang lebih lama jika dibandingkan dengan kebutuhan metabolit sekunder yang sangat tinggi bagi industri. Kebutuhan industri terhadap metabolit sekunder juga dipengaruhi oleh sistem budidaya sesuai standar dan keadaan lingkungan seperti tanah, nutrisi, iklim, hama dan penyakit. Sehingga salah satu upaya yang dapat dilakukan untuk meningkatkan biomassa dan produksi metabolit sekunder yaitu dengan cara kultur *in vitro* (Isah *et al.*, 2017).

Teknik kultur jaringan merupakan salah satu alternatif yang dapat digunakan untuk peningkatan biomassa dan metabolit sekunder secara *in vitro*. Peningkatan biomassa dan metabolit sekunder dapat dilakukan dengan pemberian faktor cekaman berupa cahaya, suhu dan manipulasi nutrisi media kultur seperti pemberian konsentrasi elisitor atau pemberian konsentrasi sukrosa pada media kultur (Narayani dan Srivastava, 2017). Keberhasilan untuk meningkatkan biomassa dan metabolit sekunder melalui teknik kultur jaringan telah banyak dilakukan dalam beberapa penelitian yang telah dilakukan pada tanaman seperti *Solanum nigrum* Linn., *Salvia lerifolia* Benth. Dan *Gynura procumbens* Lour. (Mujeeb *et al.*, 2017; Modarres *et al.*, 2018; Nurokhman *et al.*, 2018).

Salah satu peningkatan kadar metabolit sekunder yang dapat dilakukan dengan mudah dan efektif yaitu dengan cara penambahan variasi konsentrasi sukrosa pada media kultur. Pemberian sukrosa pada media kultur dapat mempengaruhi produksi metabolit sekunder pada kalus tanaman. Menurut

Mamdouh (2022), pemberian konsentrasi sukrosa pada media kultur dapat meningkatkan senyawa flavonoid dan fenolik. Sukrosa memiliki peran ganda yaitu sebagai sumber karbon dan pengatur metabolisme dalam pertumbuhan dan perkembangan tanaman (Moriyama *et al.*, 2016).

Sukrosa merupakan sumber karbon yang dibutuhkan oleh tanaman. Sumber karbon berfungsi sebagai sumber energi yang dibutuhkan oleh sel untuk dapat melakukan pertumbuhan. Sukrosa memerlukan pembelahan pada ikatan glycosydic α 1- β 2 oleh invertase (INV) menjadi heksosa (fruktosa dan glukosa) (Zhao *et al.*, 2015). pembelahan pada ikatan sukrosa menjadi heksosa (fruktosa dan glukosa) dilakukan oleh enzim CWIN (*Cell Wall Intervase*) yang berfungsi untuk mengkatalis pemecahan irreversibel sukrosa menjadi produk baru yakni glukosa dan fruktosa. CWIN juga berperan dalam pleiotropis seperti perkembangan bunga, buah, perkecambahan dan respon cekaman sinyal gula yang mengakibatkan metabolisme kalus mengalami perubahan signifikan, dimana terjadinya penurunan aktifitas sintesis metabolit primer dan kalus lebih banyak mensintesis metabolit sekunder sebagai bentuk pertahanan (Liu, Offler and Ruan, 2016). Glukosa dan fruktosa sebagai hasil hidrolisis sukrosa dapat merangsang pembelahan sel pada beberapa jaringan tumbuhan secara langsung (Zhong *et al.*, 2020).

Pemberian konsentrasi sukrosa sebagai sumber karbon pada media *in vitro* dapat mempercepat pembelahan sel yang menghasilkan peningkatan berat kalus (Yaseen *et al.*, 2013). Pemberian konsentrasi sukrosa yang lebih pekat dalam media menyebabkan gerakan air melintasi membran ke arah yang konsentrasinya

tinggi. Sel pada eksplan dapat mengalami kehilangan air apabila potensial air di luar sel lebih rendah daripada potensial air di dalam sel. Kehilangan tersebut akan membuat sel mengalami plasmolisis. Menurut Neto and Otoni (2003) konsentrasi gula yang semakin tinggi mengakibatkan turunnya nilai potensial osmotik sehingga eksplan menjadi tercekam dan berakibat pada turunnya laju pertumbuhan. Cekaman pada eksplan tersebut akan membuat sel memproduksi metabolit sekunder sebagai respon cekaman. Konsentrasi sukrosa yang optimal akan menghasilkan biomassa kalus terbaik sehingga membuat kalus tidak lagi membutuhkan karbon untuk metabolit primer. Penurunan sintesis metabolit primer membuat metabolit sekunder lebih aktif disintesis oleh karbon pada media kultur (Bottger *et al.*, 2018).

Pemberian sukrosa dengan konsentrasi yang berbeda untuk meningkatkan biomassa kalus telah banyak dilakukan diberbagai penelitian, seperti pada penelitian yang dilakukan oleh Ali *et al.* (2016) yang menghasilkan konsentrasi biomassa kering kalus terbaik sebesar 8,8 g/l pada konsentrasi sukrosa 30 g/l. Pemberian sukrosa meningkatkan biomassa kalus juga dilakukan oleh (Elgirban *et al.*, 2012) menghasilkan konsentrasi biomassa kering kalus terbaik sebesar 5,2 g/l pada konsentrasi sukrosa 50 g/l. Berdasarkan kedua penelitian tersebut menunjukkan semakin meningkatnya pemberian sukrosa didalam media yang berfungsi sebagai sumber karbon bagi pertumbuhan kalus akan memberikan peningkatan pertumbuhan kalus sampai pada batas konsentrasi optimal yang diperlukan bagi pertumbuhan kalus (Jan *et al.*, 2020).

Pemberian sukrosa dengan varian konsentrasi untuk meningkatkan produksi metabolit sekunder telah banyak dilakukan diberbagai penelitian, seperti pada penelitan yang dilakukan oleh Fazal *et al.* (2015) dengan menggunakan varian konsentrasi sukrosa pada kalus tanaman *Prunella vulgaris* L. dengan hasil analisis yang senyawa fenolik terbaik sebesar 12,3 mg/g pada konsentrasi sukrosa 20 g/l dan senyawa flavonoid terbaik sebesar 2,36 mg/g pada konsentrasi sukrosa 25 g/l. Pemberian sukrosa dengan varian konsentrasi untuk meningkatkan produksi metabolit sekunder juga dilakukan oleh Julianti *et al.* (2021) pada kalus tanaman *Solanum lycopersicum* syn. *Lycopersicum esculentum*. dengan hasil analisis metabolit yang menghasilkan senyawa flavonoid terbaik sebesar $1,19 \pm 0,09$ pada konsentrasi sukrosa 40 g/l.

Penggunaan sukrosa sebagai penghasil senyawa fenolik dan flavonoid telah banyak digunakan diberbagai jenis tanaman, seperti pada tanaman *Lycium schweinfurthii* (Mamdouh, 2022) dan pada tanaman *Fagonia indica* sebagai penghasil senyawa fenolik (Khan *et al.*, 2018) Namun, penggunaan konsentrasi sukrosa yang optimal pada tanaman *T. diversifolia* sebagai pertumbuhan biomassa kalus dan penghasil metabolit sekunder berjenis fenolik dan flavonoid masih belum pernah dipelajari. Oleh karena itu, pada penelitian ini akan dilakukan pemberian sukrosa untuk menginduksi kalus dan produksi senyawa fenolik dan flavonoid pada tanaman *T. diversifolia*.

1.2 Rumusan Masalah

- a. Bagaimana pengaruh variasi konsentrasi sukrosa terhadap pertumbuhan kalus tanaman paitan (*T. diversifolia*)?
- b. Bagaimana pengaruh variasi konsentrasi sukrosa terhadap senyawa fenolik dan flavonoid tanaman paitan (*T. diversifolia*)?

1.3 Tujuan

- a. Mengetahui pengaruh variasi konsentrasi sukrosa terhadap pertumbuhan kalus tanaman paitan (*T. diversifolia*).
- b. Mengetahui pengaruh variasi konsentrasi sukrosa terhadap produksi senyawa fenolik dan flavonoid tanaman paitan (*T. diversifolia*).

1.4 Manfaat

- a. Bidang Pendidikan

Hasil penelitian ini diharapkan dapat dijadikan sebagai referensi tambahan dalam bidang ajar maupun referensi untuk penelitian-penelitian selanjutnya mengenai pengaruh variasi konsentrasi sukrosa terhadap pertumbuhan biomassa kalus dan produksi flavonoid dan fenolik total pada kultur kalus daun tanaman insulin (*T. diversifolia*).

- b. 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

- a. Variasi konsentrasi sukrosa yang digunakan terdiri atas 6 perlakuan, diantaranya 30, 40, 50, 60, 70 dan 80 g/L pada media perlakuan kalus tanaman paitan (*T. diversifolia*).
- b. ZPT yang digunakan untuk menginduksi kalus yaitu NAA dengan konsentrasi 2 ppm dan BAP dengan konsentrasi 0,5 ppm.
- c. Metabolit sekunder yang dianalisis pada penelitian ini yaitu total flavonoid dan fenolik

1.6 Hipotesis

- a. Terdapat pengaruh pemberian variasi konsentrasi sukrosa terhadap pertumbuhan biomassa kalus tanaman insulin (*T. diversifolia*).
- b. Terdapat pengaruh pemberian variasi konsentrasi sukrosa terhadap peningkatan flavonoid dan fenolik total pada kultur kalus daun tanaman insulin (*T. diversifolia*).

UIN SUNAN AMPEL
S U R A B A Y A

BAB II

KAJIAN PUSTAKA

2.1 Paitan (*Tithonia diversifolia*)

Tumbuhan paitan atau kembang bulan (*Tithonia diversifolia*) merupakan tumbuhan semak abadi atau tahunan yang berasal dari negara Meksiko yang tersebar di berbagai negara di benua seperti Afrika, Australia, dan Asia. Tumbuhan paitan (*T. diversifolia*) merupakan spesies invasif yang menjadi gulma dengan pertumbuhan agresif sehingga sangat mudah dijumpai di berbagai daerah di Indonesia salah satunya di pulau Jawa. Persebaran tumbuhan paitan (*T. diversifolia*) dipengaruhi oleh kemampuan hidup di berbagai kondisi tanah (Nurika *et al.*, 2019). Paitan termasuk dalam keluarga bunga matahari (Asteraceae) yang dapat dilihat pada gambar 2.1.



Gambar 2.1 Tanaman Paitan (*Tithonia diversifolia*) (Omolola, 2019).

Adapun klasifikasi tumbuhan paitan menurut (*T. diversifolia*) (Amanatie, 2015):

Kingdom : Plantae
Division : Spermatophyta
Sub division : Angiospermae
Class : Dicotyledoneae

Ordo : Asterales
Family : Asteraceae
Genus : *Tithonia*
Spesies : *Tithonia diversifolia* (Hemsley) A. Glay

Tumbuhan paitan (*T. diversifolia*) adalah perdu yang dapat tumbuh hingga setinggi 1,2-2,5 meter (Azwana *et al.*, 2019). Tumbuhan paitan (*T. diversifolia*) memiliki ciri Batang tegak, bulat, berkayu hijau. Daunnya tunggal, berseling dengan ujung runcing, pertulangan menyirip dan berwarna hijau. Bunga merupakan bunga majemuk, berbulu halus dan berwarna kuning. Akarnya berupa akar tunggang berwarna putih kotor (Lestari, 2016).

Tumbuhan paitan (*T. diversifolia*) banyak ditemukan pada tepi jalan raya, tepi kebun, lereng-lereng bukit dan dekat perairan/sungai yang memiliki suhu lembab. Tanaman paitan dapat tumbuh pada 550-1950 m di atas permukaan laut dengan suhu berkisar 15-31°C dengan curah hujan 100-2000 mm (Desyrakhmawati *et al.*, 2015). Senyawa aktif yang dikandung *T. diversifolia* yang tumbuh di daerah dataran rendah lebih banyak dibandingkan dengan *T. diversifolia* yang tumbuh di daerah dataran tinggi. Faktor-faktor yang mempengaruhi banyaknya senyawa aktif yang dikandung oleh *T. diversifolia* adalah faktor habitat tempat tumbuh seperti iklim, tanah dan lain-lain, hal ini sesuai dengan penelitian Puspita sari *et al.*, (2013) bahwa dataran rendah secara umum memiliki kondisi tanah subur dengan ketersediaan air cukup serta memiliki intensitas cahaya dan suhu udara yang cukup tinggi dengan curah hujan. Hal ini yang mengakibatkan tumbuhan pada dataran rendah memiliki kandungan senyawa yang lebih tinggi daripada tumbuhan pada dataran tinggi.

Tithonia diversifolia dapat berkembang biak dengan biji (generatif) maupun stek batang (vegetatif), namun perbanyakan *T. diversifolia* lebih sering dilakukan oleh masyarakat melalui stek batang karena mudah dan pertumbuhan tanaman lebih cepat (Galindo *et al.*, 2017). Perbanyakan *T. diversifolia* dengan metode stek batang dilakukan karena *T. diversifolia* hanya mampu menghasilkan sekitar 8.000 hingga 160.000 biji/m² setiap tahunnya dengan tingkat perkecambahan berkisar antara 18-56%. Jika dibandingkan dengan besarnya pemanfaatan *T. diversifolia* yang mencapai produksi biomassa yang banyak (± 275 t/ha/thn produksi segar atau 55 t/ha/thn produksi BK), maka perbanyakan *T. diversifolia* lebih efektif dengan menggunakan stek batang (Sirait and Simanihuruk, 2021).

Tumbuhan paitan (*T. diversifolia*) memiliki kandungan metabolit yang beragam jenisnya. Menurut Rinawati *et al.*, (2019) bahwa pada daun *T. diversifolia* mengandung senyawa metabolit sekunder berjenis tannin, flavonoid dan fenolik. Senyawa metabolit berjenis alkaloid, saponin, saponin glikosida, tanin, balsam, glikosida jantung dan minyak volatile juga ditemukan pada ekstrak *T. diversifolia* (John-Dewole, 2013).

Tumbuhan paitan (*T. diversifolia*) telah lama dimanfaatkan sebagai tanaman obat-obatan oleh masyarakat di Indonesia, seperti sebagai obat diare, malaria dan diabetes (Wahyuningsih *et al.*, 2015). Tumbuhan paitan (*T. diversifolia*) dimanfaatkan sebagai pupuk organik dibidang pertanian sayur-sayuran seperti brokoli (Rahardian *et al.*, 2017). Tumbuhan paitan (*T. diversifolia*) juga berperan sebagai pestisida dibidang pertanian sayuran seperti sawi untuk mortalitas larva *Crociodomia binotalis* sehingga tingkat kerusakan tanaman sayuran seperti sawi

dapat diminalisir. Peranan daun tumbuhan paitan (*T. diversifolia*) sebagai pestisida dipengaruhi oleh kandungan senyawa metabolit sekunder yang dikandungnya (Dwi, 2017).

Firman Allah Subhanahu wata'ala dalam surah Luqman 31:10

خَلَقَ السَّمَوَاتِ بِغَيْرِ عَمَدٍ تَرَوْنَهَا وَالْأَرْضِ فِي الْأَرْضِ رَوَاسِيَ أَنْ تَمِيدَ بِكُمْ وَبَثَّ فِيهَا مِنْ كُلِّ دَابَّةٍ وَأَنْزَلْنَا
مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ ۝

Artinya: Dia menciptakan langit tanpa tiang (seperti) yang kamu lihat dan meletakkan di bumi gunung-gunung (yang kukuh) agar ia tidak mengguncangkanmu serta menyebarkan padanya (bumi) segala jenis makhluk bergerak. Kami (juga) menurunkan air hujan dari langit, lalu Kami menumbuhkan padanya segala macam tumbuh-tumbuhan yang baik.

Menurut Tafsir Ibnu Katsir, Kata tumbuhan yang baik juga dapat diartikan sebagai baik karena memiliki warna yang indah dan manfaat yang banyak. Allah menciptakan tumbuhan yang baik agar dimanfaatkan oleh manusia sebagai makanan atau sebagai obat-obatan untuk menyembuhkan atau dapat juga disebut sebagai obat herbal (Abdullah, 2003).

2.2 Kultur Jaringan

Kultur jaringan merupakan teknik perkembang biakan tanaman secara vegetatif yang dilakukan dengan cara mengisolasi sel, jaringan dan organ pada medium buatan yang kaya akan nutrisi secara aseptik sehingga bagian tanaman tersebut dapat tumbuh menjadi tanaman utuh (Sahetapy, 2015).

Sel tanaman yang diisolasi sebagai bahan awal kultur *in vitro* disebut dengan eksplan. Seluruh organ tanaman dapat digunakan sebagai eksplan pada kultur jaringan, namun umumnya eksplan yang digunakan pada kultur jaringan

merupakan eksplan yang masih muda (primordia), hal ini dikarenakan eksplan yang masih muda memiliki sifat meristematis dan sudah mengalami proses diferensiasi (Erawati *et al.*, 2018). Pemilihan eksplan yang masih muda dipengaruhi oleh cepatnya proses pertumbuhan kalus pada media kultur jaringan. Pertumbuhan kalus juga dipengaruhi oleh media yang kaya akan nutrisi dengan tambahan ZPT yang optimal pada kultur *in vitro* (Fauzy *et al.*, 2016).

Kultur jaringan memiliki kelebihan dibandingkan dengan teknik perbanyakan tanaman lainnya yakni dapat menghasilkan bibit yang sehat dan seragam dalam jumlah besar dalam kurun waktu yang relatif singkat, perbanyakannya tidak membutuhkan tempat yang luas, dapat dilakukan sepanjang tahun yang tidak bergantung pada musim, sehingga ketersediaan bibit terjamin (Pebrar *et al.*, 2014). Kultur jaringan juga dapat dimanfaatkan sebagai alternatif produksi metabolit sekunder, dimana peningkatan metabolit sekunder pada eksplan tanaman herbal dapat bermanfaat dibidang farmasi sebagai obat-obatan (Laila, 2014).

2.3 Induksi Kalus

Induksi kalus merupakan tahap awal dari teknik kultur *in vitro* yang bertujuan untuk menghasilkan dan memperbanyak sel kalus secara massal. Induksi kalus merupakan tahapan teknik kultur jaringan dengan tujuan memacu pembelahan sel eksplan seperti daun dan sebagainya dengan menggunakan zat pengatur tumbuh hingga terbentuk massa sel pada media kultur *in vitro* (Indah and Ermavitalini, 2013). Induksi kalus sangat bergantung pada ZPT (zat pengatur tumbuh) media *in vitro*. Umumnya ZPT yang banyak digunakan untuk induksi kalus adalah

kombinasi auksin dan sitokinin. Pemberian ZPT ini berperan dalam mengatur pertumbuhan dan perkembangan tanaman (Manurung *et al.*, 2018).

Kalus merupakan suatu kumpulan sel amorphous yang terjadi akibat dari sel-sel jaringan yang membelah diri secara terus menerus (Latief *et al.*, 2018). Munculnya kalus terjadi karena adanya penebalan eksplan pada bagian potongan dan di daerah yang mengalami pelukaan. Penebalan tersebut merupakan respons dari eksplan terhadap zat pengatur tumbuh yang diuji. Kalus umumnya muncul pada bagian sayatan helai daun (tepi daun), lalu disusul pada bagian tengah daun. Kalus terbentuk ditandai dengan membengkaknya permukaan eksplan dan terbentuknya tonjolan-tonjolan putih yang berjejal pada permukaan eksplan (Rasud *et al.*, 2020). Kalus merupakan bahan awal untuk pembuatan kultur suspensi sel atau subkultur untuk tujuan produksi metabolit sekunder. Kalus dengan tekstur remah merupakan kalus yang cocok sebagai bahan awal subkultur untuk produksi metabolit sekunder (Mahadi *et al.*, 2016).



Gambar 2.2 Kalus eksplan daun Tempuyung (*Sonchus arvensis*) (Rahayu and Suharyanto, 2020). Bar = 1cm

Warna kalus merupakan salah satu indikator pada induksi kalus. Pada proses induksi kalus sering kali terjadi hambatan berupa pencoklatan (*browning*) (Ananda Lutfiah, 2022). Pencoklatan (*browning*) pada kalus merupakan hal yang bersifat

alamiah yang menandakan kemunduran fisiologis kalus (Fauzy, Mansyur and Husni, 2016). Pencoklatan pada kalus dapat membuat kalus menjadi mati akibat berhentinya proses pembelahan sel pada kalus tersebut. Pencoklatan pada kalus terjadi akibat adanya pengaruh fisik seperti pengupasan, pemotongan atau pelukaan. Selain menandakan terjadinya sintesis senyawa fenol, pencoklatan pada kalus diduga terjadi akibat bertambahnya umur sel atau jaringan kalus dan terlambatnya proses subkultur, sehingga eksplan menghasilkan senyawa fenol yang tinggi dan menjadi toksik bagi eksplan serta menyebabkan perubahan warna kalus menjadi coklat (Anwar and Isda, 2021).

2.4 Metabolit Sekunder

Metabolit sekunder merupakan senyawa organik yang disintesis oleh tumbuhan sebagai respon terhadap cekaman atau gangguan dari luar baik oleh hama maupun hewan pemangsa (Mainawati dkk, 2019). Metabolit sekunder merupakan senyawa kimia turunan dari proses metabolisme tumbuhan, metabolit sekunder dibutuhkan tanaman untuk perlindungan tanaman dari gangguan dari luar namun tidak terlibat dengan perkembangan dan pertumbuhan tanaman (Zachariah & Leela, n.d., 2018). Senyawa metabolit sekunder merupakan senyawa yang dapat ditemukan diberbagai jenis tanaman. Metabolit sekunder tanaman memiliki berbagai manfaat bagi manusia, seperti sebagai obat-obatan, bumbu masakan, bahan kosmetik, bibit parfum dan lain sebagainya (Silalahi, 2019).

Metabolit sekunder digolongkan sebagai molekul besar atas fenolik, alkaloid, flavonoid, terpenoid, steroid dan saponin (Saifudin, 2014). Klasifikasi metabolit sekunder dilakukan berdasarkan struktur kimianya, komposisi, jalur biosintesis

dan kelarutannya sebagai pelarut (Tiwari, 2015). Metabolit sekunder merupakan senyawa yang tidak terlibat langsung dalam pertumbuhan, perkembangan, atau reproduksi makhluk hidup. Namun, senyawa ini biasa digunakan untuk perkembangbiakan dan pertahanan tanaman karena umumnya senyawa metabolit sekunder bersifat racun bagi hewan (Kusbiantoro, 2018). Senyawa metabolit sekunder seperti isoflavonoid, terpen, alkaloid dan poliasitilen dapat berperan sebagai pertahanan tanaman dari hewan herbivora, dimana senyawa tersebut dapat membuat tanaman menghasilkan rasa pahit dan racun yang langsung muncul ketika tanaman tersebut dimakan oleh hewan herbivora (Angelika Bottger *et al.*, 2018).

Produksi metabolit sekunder secara *in vitro* dapat dilakukan pemberian faktor cekaman berupa cahaya, suhu, kekeringan, pelukaan dan manipulasi media kultur seperti pemberian konsentrasi elisitor atau pemberian konsentrasi sukrosa pada media kultur (Narayani and Srivastava, 2017; Rudin, 2020).

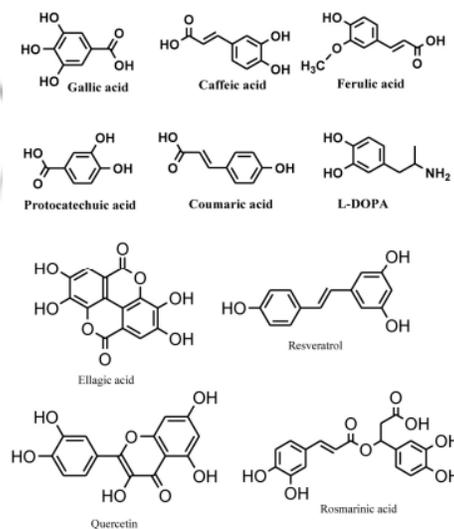
2.4.1 Fenolik

Fenolik merupakan metabolit sekunder terbesar dalam tumbuhan. Senyawa fenol dalam tumbuhan dapat berupa fenol, asam fenolat, tannin, lignin dan flavonoid. Tiga kelompok fenolik yang paling penting adalah flavonoid, asam fenolat, dan polifenol. Fenolik adalah gugus hidroksil (-OH) yang mengandung golongan senyawa kimia dimana (-OH) berikatan langsung dengan gugus hidrokarbon aromatic (Kurmukov, 2013).

Fenolik tumbuhan merupakan kelompok yang secara kimiawi heterogen, hampir 10.000 berupa senyawa tunggal. Senyawa fenolik

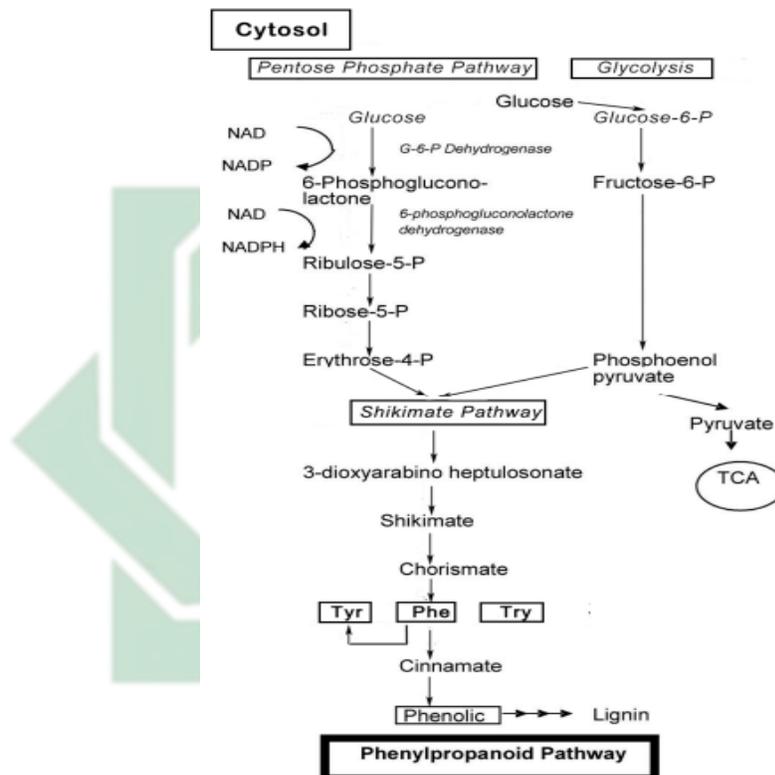
biasanya dikaitkan dengan respon pertahanan pada tumbuhan. Namun senyawa fenolik juga berperan penting dalam proses-proses lain, misalnya atraktan zat untuk mempercepat polinasi, warna untuk kamuflase dan pertahanan terhadap herbivor, dan aktivitas antibakteri dan antifungi (Edreva *et al.*, 2008; Pereira *et al.*, 2009). Senyawa fenolik terdiri dari berbagai kelompok flavonoid sederhana, asam-asam fenolat, flavonoid kompleks, dan antosianin (Pereira *et al.*, 2009).

Senyawa fenolik merupakan senyawa metabolit sekunder yang cukup luas pemanfaatannya saat ini. Kemampuannya sebagai senyawa aktif memberikan suatu peran yang besar terhadap kepentingan manusia. Salah satunya sebagai antioksidan untuk pencegahan dan pengobatan penyakit degeneratif, kanker, penuaan dini dan gangguan sistem imun tubuh pada manusia (Ahmad *et al.*, 2015). Struktur kimia dari beberapa senyawa fenolik yang sering ditemukan pada tumbuhan tertera pada Gambar 2.5.



Gambar 2.3 Senyawa yang sering ditemukan pada tumbuhan (Lin *et al.*, 2016)

Biosintesis senyawa fenolik dapat melalui asam sikimat. Jalur asam sikimat digunakan dalam sintesis kelompok tanin yang dapat terhidrolisis dan senyawa-senyawa berbasis asam amino fenilalanin, misalnya lignin (Lin *et al.*, 2016).

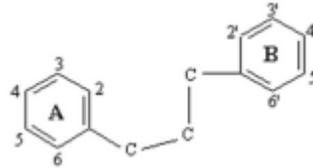


Gambar 2.4 Biosintesis Senyawa Fenolik (Lin *et al.*, 2016)

2.4.2 Flavonoid

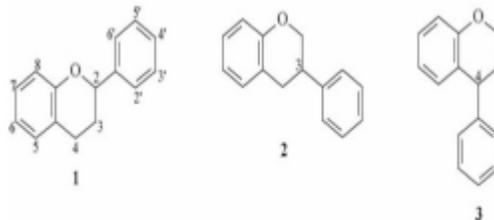
Flavonoid merupakan senyawa metabolit sekunder yang masuk dalam kelompok senyawa fenol terbesar dan banyak tersebar di alam, khususnya di tanaman hijau yang mengandung banyak klorofil. Bagian tumbuhan yang sering terdapat senyawa flavonoid ialah bagian dari akar, kulit batang, bunga, buah dan biji (Ikalinus *et al.*, 2015). Flavonoid di alam sering dijumpai dalam bentuk glikosida. Terdapat sekitar 10 jenis flavonoid yaitu

antosianin, proantosianidin, khalkon, auron, flavanon, flavonol, flavon, glikoflavon, biflavon dan isoflavon. Flavonoid memiliki struktur kimia dengan susunan C₆-C₃-C₆ (Susi, 2019). Struktur dari flavonoid dapat dilihat pada gambar 2.3



Gambar 2.5 Struktur Flavonoid (Susi, 2019)

Susunan senyawa C₆-C₃-C₆ 3 (berdasarkan posisi ikatan cincin) menghasilkan turunan senyawa flavonoid yaitu flavonoid, isoflavonoid dan neoflavonoid (Susi, 2019). Struktur kimia senyawa tersebut tertera pada Gambar 2.4



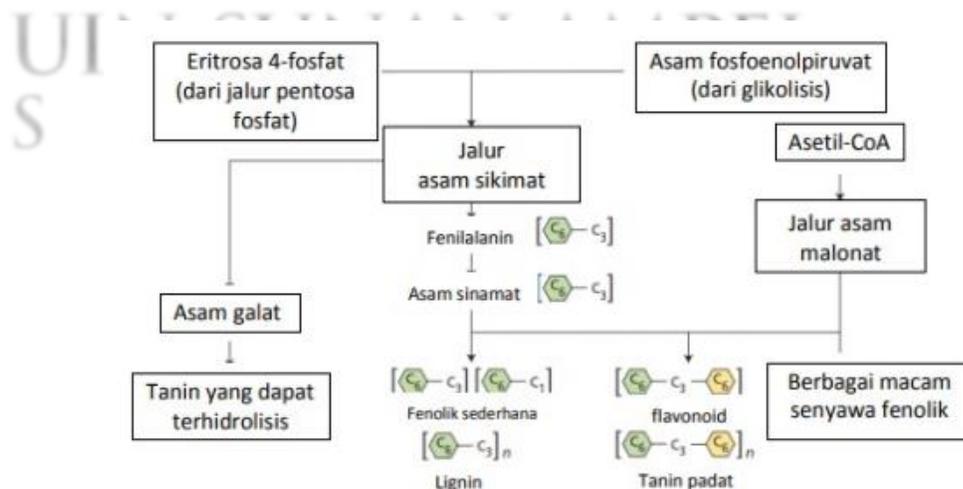
Gambar 2.6 Struktur 1) flavonoid; 2) isoflavonoid; 3) neoflavonoid (Susi, 2019)

Flavonoid memiliki manfaat sebagai antioksidan, antikanker dan agen detoksifikasi (Kurmukov, 2013). Flavonoid juga memainkan peran penting dalam melindungi sistem biologis terhadap efek berbahaya dari proses oksidatif pada tanaman.

Flavonoid juga termasuk substansi berbagai warna. Antosianin merupakan kelompok flavonoid berwarna yang paling tersebar, bertanggung jawab untuk sebagian besar warna merah, merah muda, ungu, dan biru pada

bunga dan buah (Priska *et al.*, 2018). Pemeriksaan senyawa flavonoid dapat dilakukan menggunakan pereaksi Wilstater atau Sianidin. Hasil ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambah dengan HCl pekat kemudian ditambahkan pita logam magnesium (Mg). Perubahan warna larutan menjadi warna merah, oranye atau hijau menunjukkan adanya senyawa flavonoid (Endarini, 2016).

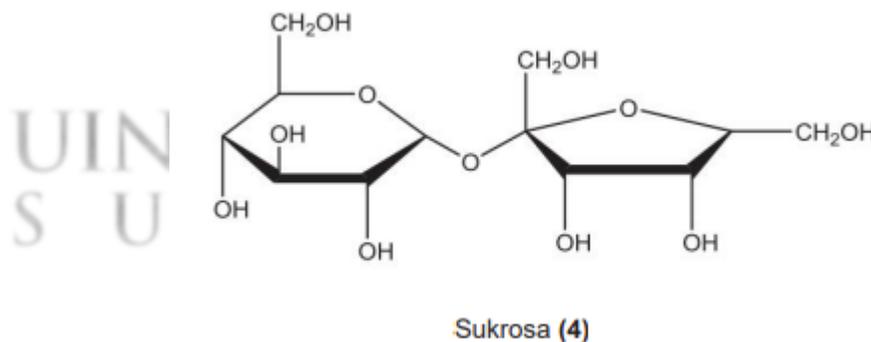
Biosintesis senyawa flavonoid terjadi melalui 2 jalur, yaitu jalur asam sikimat dan jalur asam malonat. Jalur asam sikimat digunakan dalam sintesis kelompok tanin yang dapat terhidrolisis dan senyawa-senyawa berbasis asam amino fenilalanin, misalnya lignin. Asam malonat memanfaatkan asetil-koA sebagai bahan utama. Meskipun bukan merupakan jalur utama, namun senyawa intermediet dibutuhkan dalam sintesis berbagai MS dengan penggabungan produk senyawa intermediet dari jalur asam sikimat, misalnya dalam pembentukan kelompok flavonoid atau tanin yang tidak mudah terhidrolisis (Cheynier *et al.*, 2013).



Gambar 2.7 Biosintesis Senyawa Flavonoid (Cheynier *et al.*, 2013)

2.5 Sukrosa

Sukrosa atau gula tebu adalah disakarida dari glukosa dan fruktosa. Sukrosa dibentuk oleh banyak tanaman, tetapi tidak terdapat pada hewan tingkat tinggi. Hewan tidak dapat menyerap sukrosa seperti pada tanaman, tetapi dapat menyerap molekul tersebut dengan bantuan enzim sukrosa. Sukrosa merupakan produk fotosintesis antara yang utama. Pada banyak tanaman sukrosa merupakan bentuk utama dalam transport gula dari daun ke bagian lain tanaman melalui sistem vaskular. Sukrosa merupakan disakarida yang paling manis diantara ketiga jenis disakarida yang umum dijumpai dalam bentuk gula pasir dan dapat larut di dalam air, alkohol maupun eter serta biasanya ditemukan dalam bentuk kristal (Heriansyah, 2019). sukrosa adalah gabungan dari glukosa dan fruktosa dengan rumus molekul $C_{12}H_{22}O_{11}$. Struktur kimia senyawa tersebut tertera pada Gambar 2.6.



Gambar 2.8 Struktur kimia sukrosa (Murcia *et al.*, 2017)

Sukrosa merupakan sumber karbon yang dibutuhkan oleh tanaman. Sumber karbon berfungsi sebagai sumber energi yang dibutuhkan oleh sel untuk dapat melakukan pertumbuhan. Sukrosa memerlukan pembelahan pada ikatan

glycosydic α 1- β 2 oleh invertase (INV) menjadi heksosa (fruktosa dan glukosa) (Zhao *et al.*, 2015). Pada kultur *in vitro*, sukrosa dimanfaatkan sebagai sumber energi dan karbon dalam pertumbuhan kalus. Sukrosa juga dapat menjadi faktor cekaman untuk meningkatkan produksi metabolit sekunder pada kalus tanaman (Julianti *et al.* 2021).

2.6 Ekstraksi

Ekstraksi merupakan suatu proses penarikan kandungan kimia dari suatu bahan yang dapat larut sehingga terpisah dari bahan yang tidak dapat larut dengan pelarut cair (Tambun *et al.*, 2017). Simplisia yang diekstrak umumnya memiliki senyawa aktif yang dapat larut dan senyawa yang tidak dapat larut seperti serat, karbohidrat, dan protein. Beberapa jenis senyawa aktif yang ada di dalam simplisia yaitu alkaloid, flavonoid, minyak atsiri, dan lain-lain (sariyem *et. al.*, 2015). Struktur kimia yang berbeda-beda akan mempengaruhi kelarutan serta stabilitas senyawa aktif yang ada dalam simplisia terhadap pemanasan, udara, cahaya, logam berat dan derajat keasaman. Dengan diketahuinya senyawa aktif dalam suatu simplisia, maka pemilihan pelarut dan cara ekstraksi dapat dilakukan dengan cepat dan tepat (Paramita *et al.*, 2022).

Ekstraksi bahan alam bertujuan untuk menarik komponen kimia yang terdapat dalam suatu bahan alam yang didasarkan pada prinsip perpindahan massa komponen zat ke dalam pelarut dimulai dari lapisan antar muka kemudian berdifusi masuk ke dalam pelarut (Meigaria *et. al.*, 2016). Pelarut yang baik adalah pelarut yang dapat melarutkan zat aktif dari ekstrak serta membebaskan ekstrak dari senyawa lain yang tidak diinginkan. Pelarut yang diperbolehkan yaitu air,

etanol, campuran etanol air, metanol, kloroform, eter, dan heksan (Yosephine *et al.*, 2011).

2.7 Uji Kadar Fenolik Total

Uji kandungan Fenolik dapat dilakukan dengan uji warna ciri spectrum UV. Identifikasi yang biasa digunakan secara luas yaitu pengukuran spektrum serapan dengan menggunakan spektrofotometer. Pengukuran kadar fenolik dengan spektrofotometer UV-VIS ini tidak akan merusak senyawa fenolik dan dapat digunakan lagi untuk uji yang lain.

Spektrofotometri merupakan salah satu alat yang digunakan sebagai alternatif untuk menganalisa berapa jauh energi yang diserap oleh absorbansi yang sudah terisolasi pada panjang gelombang. Sinar yang dihasilkan dari spektrum dan panjang gelombang tertentu dinamakan dengan spektrofotometer (Putri, 2017). Analisis kualitatif flavonoid dapat dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Spektrum serapan ultra violet dan serapan tampak merupakan cara tunggal yang paling bermanfaat untuk mengidentifikasi struktur flavonoid. Flavonoid menunjukkan pita serapan kuat pada UV-Vis. Metode tersebut juga dapat digunakan untuk melakukan uji secara kuantitatif untuk menentukan jumlah fenolik yang terdapat dalam ekstrak dilakukan dengan mengukur nilai absorbansinya (Satria *et al.*, 2022).

Pada spektrofotometri Uv-Vis, cahaya yang digunakan memiliki kisaran panjang gelombang (180–380) nm untuk sinar ultraviolet dan (380–780) nm untuk sinar tampak (visible) (Putri, 2017). Larutan standar yang digunakan untuk uji kadar fenolik yaitu asam galat (Dewantara *et al.*, 2021). Panjang gelombang *Gallic*

Acid Equivalent pada setiap sampel yang dihasilkan umumnya berbeda, namun Susanti dan Bachmid (2016) menyatakan panjang gelombang maksimal yang digunakan untuk pengujian kadar fenolik dengan larutan asam galat mencapai 760 nm.

Adapun hal-hal yang harus diperhatikan dalam spektrofotometri menurut (Putri, 2017) agar hasil yang dihasilkan lebih maksimal adalah:

- a. Pada saat pengenceran alat-alat pengenceran harus betul-betul bersih tanpa adanya zat pengotor.
- b. Dalam penggunaan alat-alat harus betul-betul steril.
- c. Jumlah zat yang dipakai harus sesuai dengan yang telah ditentukan.
- d. Dalam penggunaan spektrofotometri uv, sampel harus jernih dan tidak keru.

Dalam penggunaan spektrofotometri uv-vis, sampel harus berwarna.

2.8 Uji Kadar Flavonoid Total

Uji kandungan flavonoid dapat dilakukan dengan uji warna ciri spectrum UV. Identifikasi yang biasa digunakan secara luas yaitu pengukuran spektrum serapan dengan menggunakan spektrofotometer. Pengukuran kadar flavonoid dengan spektrofotometer UV-VIS ini tidak akan merusak senyawa flavonoid dan dapat digunakan lagi untuk uji yang lain.

Spektrofotometri merupakan salah satu alat yang digunakan sebagai alternatif untuk menganalisa berapa jauh energi yang diserap oleh absorbansi yang sudah terisolasi pada panjang gelombang. Sinar yang dihasilkan dari spektrum dan panjang gelombang tertentu dinamakan dengan spektrofotometer (Putri, 2017).

Analisis kualitatif flavonoid dapat dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Spektrum serapan ultra violet dan serapan tampak merupakan cara tunggal yang paling bermanfaat untuk mengidentifikasi struktur flavonoid. Flavonoid menunjukkan pita serapan kuat pada UV-Vis. Metode tersebut juga dapat digunakan untuk melakukan uji secara kuantitatif untuk menentukan jumlah flavonoid yang terdapat dalam ekstrak dilakukan dengan mengukur nilai absorbansinya (Satria *et al.*, 2022).

Pada spektrofotometri Uv-Vis, cahaya yang digunakan memiliki kisaran panjang gelombang (180–380) nm untuk sinar ultraviolet dan (380–780) nm untuk sinar tampak (visible) (Putri, 2017). Larutan standar yang digunakan untuk uji kadar flavonoid yaitu kuersetin (Riwanti *et al.*, 2018). Panjang gelombang kuersetin pada setiap sampel yang dihasilkan umumnya berbeda, namun Aminah *et al.* (2017) menyatakan panjang gelombang maksimal yang digunakan untuk pengujian kadar flavonoid dengan larutan standar kuersetin mencapai 510 nm.

Adapun hal-hal yang harus diperhatikan dalam spektrofotometri menurut (Putri, 2017) agar hasil yang dihasilkan lebih maksimal adalah:

- e. Pada saat pengenceran alat alat pengenceran harus betul-betul bersih tanpa adanya zat pengotor.
- f. Dalam penggunaan alat-alat harus betul-betul steril.
- g. Jumlah zat yang dipakai harus sesuai dengan yang telah ditentukan.
- h. Dalam penggunaan spektrofotometri uv, sampel harus jernih dan tidak keru.
- i. Dalam penggunaan spektrofotometri uv-vis, sampel harus berwarna.

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan satu faktor perlakuan, yaitu penambahan sukrosa dengan 6 taraf konsentrasi (30, 40, 50, 60, 70 dan 80 g/L) dengan 4 ulangan. Penentuan konsentrasi perlakuan ini berdasarkan pada penelitian yang telah dilakukan oleh Fazal *et al.* (2015), Mamdouh (2022) dan Julianti *et al.* (2021). Untuk pengulangan sampel rumus yang digunakan adalah rumus Federer (Indratama dan Yenita, 2019).

Rumus Federer : $(n-1) (t-1) \geq 15$

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

$(n-1) (6-1) \geq 15$

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

$(n-1) \geq 3$

$n \geq 4$

Keterangan:

n = Total pengulangan

t = Perlakuan dalam 1x pengulangan

Setiap pengulangan terdiri dari 2 eksplan daun *Tithonia diversifolia*, sehingga total percobaan atau total eksplan yaitu sebanyak 60 eksplan.

Rancangan penelitian dapat dilihat pada tabel 3.1 berikut:

Tabel 3.1 Rancangan Penelitian

Ulangan	Perlakuan					
	A	B	C	D	E	F
1	A1	B1	C1	D1	E1	F1
2	A2	B2	C2	D2	E2	F2
3	A3	B3	C3	D3	E3	F3
4	A4	B4	C4	D4	E4	F4
5	A5	B5	C5	D5	E5	F5

Keterangan

A : Konsentrasi sukrosa 30 g/l

B : Konsentrasi sukrosa 40 g/l

C : Konsentrasi sukrosa 50 g/l

D : Konsentrasi sukrosa 60 g/l

E : Konsentrasi sukrosa 70 g/l

F : Konsentrasi sukrosa 80 g/l

3.2 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari 2023 hingga Juli 2023 yang bertempat di Laboratorium Kultur Jaringan Tumbuhan Universitas Islam Negeri Sunan Ampel Surabaya. Adapun jadwal pelaksanaan penelitian dapat dilihat pada tabel 3.2 dibawah ini:

Tabel 3.2 Jadwal pelaksanaan penelitian

No	Kegiatan	Bulan (2022)										Bulan 2023					
		4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	
1	Pembuata proposal																
2	Seminar proposal																
3	Persiapan																
4	Aklimatisasi tanaman																
5	Pembuatan media																
6	Sterilisasi																
7	Penanaman eksplan																
8	Subkultur kalus																
9	Pengamatan																
10	Analisis data																
11	Penulisan skripsi																
12	Sidang skripsi																

3.3 Alat dan Bahan

3.3.1 Alat-alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah botol kultur, gelas beaker (Merck Iwaki), gelas ukur (Merck Iwaki), erlenmeyer (Merck Duran), pengaduk, cawan petri (Merck Iwaki), tabung reaksi (Merck Iwaki), corong kaca, tabung cuvet (Merck Genesis), pinset (Merck Marwa), scalpel (Merck Marwa), gunting, hotplate (Merck Jisico), bunsen, korek api, autoklaf (Merck Hirayama), *laminar air flow* (LAF) (Merck Robust), spektrofotometer UV-Vis (Merck Genesis), oven (Merck Memmert), neraca analitik (Merck Ohaus), spatula, pipet, cawan porselin, penyemprot alkohol, bolpoin, pensil.

3.3.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksplan daun paitan (*T. diversifolia*), kalus daun paitan, media Murashigeand Skoog (MS) (Merck Pytotech), zpt NAA, zpt BAP, sukrosa (Gulaku), agar (Merck Swallow), aquades, HCl, NaOH, kertas pH (Merck MQuant Kat Nr 1.09535.0001), Pisau scapel, Tissue, Alkohol 70%, Spirtus, Bayclin aluminium foil (Merck Klinpak), plastikwrap (Merck Klinpak), kertas label,.

3.4 Variabel Penelitian

Variabel yang digunakan pada penelitian ini antara lain:

- a. Variabel bebas, berupa penambahan konsentrasi enam sukrosa pada media subkultur kalus *T. diversifolia*.

- b. Variabel terikat, meliputi biomassa segar kalus, biomassa kering kalus dan kandungan metabolit sekunder berupa fenolik dan flavonoid kalus tanaman *T. diversifolia*.
- c. Variabel kontrol, meliputi ukuran eksplan, dan jenis eksplan, media kultur, pH media, suhu, dan intensitas cahaya.

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Persiapan

- a. Tahap Identifikasi dan Aklimatisasi *T. diversifolia*.

Pada tahap ini, bibit *T. diversifolia* yang didapatkan dari toko bunga nursery green dikabupaten Mojokerto diidentifikasi terlebih dahulu dengan menggunakan aplikasi PlantNet, kemudian ciri-ciri tanaman meliputi daun dan batang dicocokkan dengan referensi artikel ilmiah (Amanatie, 2015). Tanaman *T. diversifolia* yang telah diidentifikasi kemudian diaklimatisasi selama 1 bulan pada lingkungan yang mendapatkan sinar matahari namun tidak terkena air hujan yang bertujuan untuk melindungi tanaman dari penyakit.

- b. Tahap Sterilisasi Alat dan Ruang Kerja

Pada tahap ini, dilakukan sterilisasi alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini seperti aquades, botol kultur, cawan petri, scalpel, gunting, dan pinset. Sebelum disterilisasi dengan autoklaf, alat-alat tersebut dicuci terlebih dahulu dengan sabun cuci dan dibilas dengan air bersih kemudian dikeringkan. Setelah kering, botol kultur ditutup menggunakan aluminium foil, membungkus cawan petri, pinset,

scalpel, gunting dengan kertas yang kemudian dimasukkan ke dalam plastik. Setelah semua terbungkus, alat-alat tersebut dimasukkan ke dalam autoklaf dan disterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit.

Sterilisasi ruang kerja juga harus dilakukan dengan cara membersihkan meja laboratorium dan lantai ruangan dengan desinfektan. Selain itu, *Laminar Air Flow* (LAF) sebagai tempat penanaman eksplan juga harus disterilkan menggunakan tisu yang sudah dibahasi alkohol 70% kemudian diratakan ke meja dan dinding kaca LAF. Setelah itu semua alat yang sudah disterilkan dengan autoklaf dimasukkan ke dalam LAF dengan membersihkannya terlebih dahulu menggunakan alkohol 70%. Kemudian lampu UV dinyalakan dan dibiarkan selama 30 menit. Setelah itu, lampu UV dimatikan dan diganti dengan menyalakan lampu LED dan blower pada *Laminar Air Flow* (LAF).

c. Tahap Pembuatan Media

1) Media Inisiasi

Media Inisiasi Sukrosa sebanyak 30 g/L, MS, dan ZPT (NAA 4 ppm + BAP 0,5 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 NaOH 1N setetes demi

setetes untuk menaikkan pH. Setelah itu, agar sebanyak 7 g/L dimasukkan kedalam larutan tersebut lalu dipanaskan hingga mendidih. Selanjutnya media yang sudah dipanaskan dimasukkan kedalam botol kultur sebanyak 25 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 atm selama 15 menit.

2) Media Produksi

Sukrosa 30 g/L, MS, ZPT (NAA 4 ppm + BAP 0,5 ppm), dan sukrosa dengan konsentrasi 30, 40, 50, 60, 70 dan 80 dimasukkan kedalam erlenmeyer dengan ditambahkan aquades samapai volume 500 ml 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 NaOH 1N setetes demi setetes untuk menaikkan pH. Setelah itu, agar sebanyak 8 g/L dimasukkan kedalam larutan tersebut lalu dipanaskan hingga mendidih. Selanjutnya media yang sudah dipanaskan dimasukkan kedalam botol kultur sebanyak 25 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 atm selama 15 menit.

d. Persiapan Bahan Tanaman

Tanaman *T. diversifolia* yang telah diidentifikasi berdasarkan ciri morfologinya dengan jurnal “Leaflet Tanaman Pestisida *T. diversifolia* (Hemsley) A. Gray” (Amanatie, 2015). Kemudian tanaman diaklimatisasi supaya dapat beradaptasi dan mengurangi tingkat stres tanaman pada kondisi lingkungan tanaman yang baru (Borowitzka, 2018).

3.5.2 Induksi Pembentukan Kalus

a. Tahap Sterilisasi Eksplan

Eksplan yang digunakan yaitu bagian daun muda (daun urutan kedua sampai keempat dari bagian pucuk) tanaman *T. diversifolia*. Sterilisasi eksplan dilakukan dengan cara membersihkan eksplan dengan merendam eksplan menggunakan detergen selama 5 menit kemudian dibilas dengan air mengalir hingga bersih. Selanjutnya dilakukan perendaman menggunakan clorox 10% selama 15 menit. Kemudian eksplan dibilas dengan akuades steril sebanyak 3 kali setiap 10 menit. Eksplan yang siap ditanam dimasukkan kedalam *Laminar Air Flow* (LAF) untuk tahap sterilisasi ke 2 dengan menggunakan sinar UV pada *Laminar Air Flow* (LAF). Setelah itu eksplan siap untuk ditanam.

b. Tahap Penanaman Eksplan

Penanaman eksplan dilakukan di *Laminar Air Flow* (LAF). Penanaman eksplan dilakukan dengan memotong sekeliling daun

dengan ukuran 1x1 cm. Sebelum ditanam, mulut botol dipanaskan dengan api bunsen untuk mencegah terjadinya kontaminsi. Kemudian eksplan ditanam dalam media dengan pinset steril yang sebelumnya sudah dipaaskan dengan api bunsen untuk memusnahkan spora dan jamur yang menempel pada pinset. Selanjutnya, botol ditutup dengan aluminium foil dan dilapisi dengan plastik wrap. Semua botol diinkubasi dalam ruang kultur serta diamati setiap hari selama 1 bulan.

c. Tahap Pemeliharaan Kalus

Eksplan yang sudah ditanam kemudian di inkubasi dalam ruang kultur steril pada suhu 24-25°C dengan pencahayaan 24 jam gelap untuk menghasilkan kalus selama 28 hari (Ali and Abbasi, 2014). Botol-botol kultur kemudian disemprot alkohol 70% selama 3 hari sekali untuk menjaga kebersihan ruang kultur dan mencegah terjadinya kontaminasi (Fitri *et al.*, 2012).

3.5.3 Penanaman Kalus Pada Media Perbanyakan

a. Tahap Penanaman Kalus Pada Media Perbanyakan

Kalus yang diperoleh dari media inisiasi setelah berumur 28 hari dipindah ke media dengan konsentrasi yang sama seperti media inisiasi kalus. Pemindahan kalus dilakukan secara aseptik dalam *Laminar Air Flow* (LAF) dengan menggunakan pinset yang telah disterilkan. Setelah kalus dimasukkan, botol kultur ditutup rapat dengan aluminium foil, kemudian diinkubasi dalam ruang kultur selama 28 hari.

b. Tahap Pemeliharaan Kalus

Eksplan yang sudah ditanam kemudian di inkubasi dalam ruang kultur steril pada suhu 24-25°C dengan pencahayaan 24 jam gelap untuk menghasilkan kalus selama 28 hari. Botol-botol kultur kemudian disemprot alkohol 70% selama 3 hari sekali untuk menjaga kebersihan ruang kultur dan mencegah terjadinya kontaminasi (Fitri *et al.*, 2012).

3.5.4 Penanaman Kalus Pada Media Produksi

a. Tahap Penanaman Kalus Pada Media Produksi

Kalus yang diperoleh dari media perbanyakan setelah berumur 28 hari dengan berat 0,5gr dipindah ke media produksi dengan perlakuan dari berbagai variasi konsentrasi sukrosa 30, 40, 50, 60, 70 dan 80 g/l. Pemandahan kalus dilakukan secara aseptik dalam *Laminar Air Flow* (LAF) dengan menggunakan pinset yang telah disterilkan. Setelah kalus dimasukkan, botol kultur ditutup rapat dengan aluminium foil, kemudian diinkubasi dalam ruang kultur selama 15 hari.

b. Tahap Pemeliharaan Kalus

Eksplan yang sudah ditanam kemudian di inkubasi dalam ruang kultur steril pada suhu 24-25°C dengan pencahayaan 24 jam gelap untuk menghasilkan kalus selama 15 hari (Ali dan Abbasi, 2014). Botol-botol kultur kemudian disemprot alkohol 70% selama 3 hari sekali untuk menjaga kebersihan ruang kultur dan mencegah terjadinya kontaminasi (Fitri *et al.*, 2012).

c. Tahap Pengamatan Kalus

1) Pengamatan Kalus

Pengamatan dilakukan setiap hari dengan mengamati pembentukan kalus, jika beberapa kalus terkontaminasi maka botol kultur dipindahkan dan dibersihkan. Pengamatan kalus dilakukan 15 hari yang dimulai dari pemindahan kalus ke dalam media produksi kalus yang telah diberi 6 variasi konsentrasi sukrosa.

2) Morfologi Kalus Akhir

Pengamatan morfologi kalus meliputi warna dan tekstur kalus yang dilakukan pada akhir pengamatan. Penentuan warna kalus ditetapkan berdasarkan keterangan warna kalus yaitu hijau, hijau keputihan, putih kekuningan, kuning kecoklatan, coklat, dan sebagainya. Sedangkan penentuan tekstur kalus ditetapkan berdasarkan keterangan kompak atau remah.

3) Penentuan Biomassa Kalus Akhir

Menentukan biomassa segar kalus dengan cara menimbang kalus setelah akhir pengamatan (selama 15 hari). Setelah itu dilakukan penimbangan berat kering kalus yang sebelumnya telah dioven selama 48 jam dengan suhu 40°C. Setelah itu dilakukan penimbangan biomassa kering kalus menggunakan neraca analitik. Kemudian biomassa basah dan kering kalus dicatat.

4) Ekstraksi

Kalus tanaman insulin pada semua perlakuan dikeringkan dengan menggunakan oven selama 24 hingga 48 jam dengan suhu 50°C. Setelah kering, kalus dihaluskan menggunakan mortar dan alu hingga menjadi serbuk. Sebanyak 0,05 gr serbuk diekstraksi menggunakan metode maserasi yaitu dengan cara merendam serbuk kedalam 5 ml metanol selama 24 jam. Proses ini dilakukan sebanyak 2x agar senyawa dapat larut sempurna lalu disaring. Kemudian ekstrak yang terlarut dalam metanol dipekatkan selama 4 hari. Setelah itu ekstrak metanol dipartisi menggunakan n-heksana dengan perbandingan 1:1 (7,5 ml). Lalu akan terbentuk 2 lapisan, lapisan atas diambil dan disimpan ditempat yang bersih. Sedangkan lapisan bawah dipartisi menggunakan etil asetat dengan perbandingan 1:1 (7,5 ml) untuk mengekstrak senyawa metabolit sekunder. Kemudian ekstrak etil asetat diambil sebanyak 3 ml dan dipekatkan pada suhu ruang hingga menempel pada dinding botol selama 2 hari, lalu ekstrak dapat digunakan untuk analisis kadar fenolik dan flavonoid.

5) Pembuatan Larutan Standar Asam Galat

Pembuatan larutan induk dilakukan dengan cara menimbang asam galat sebanyak 10 mg dan dilarutkan dalam metanol p.a sebanyak 100 ml, sehingga dihasilkan larutan kuersetin 100 ppm. Kemudian dilakukan pengenceran berseri dengan mengambil 1; 2; 3; 4; dan 5 ml pada larutan induk dan ditambah metanol p.a hingga

mencapai 10 ml sehingga didapatkan konsentrasi 10, 20, 30, 40, dan 50 ppm. 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 spektrofomoter UV-VIS dengan panjang gelombang 760 nm. Larutan blanko yang digunakan yaitu metanol.

6) Pembuatan Larutan Standar Kuersetin

Pembuatan larutan induk dilakukan dengan cara menimbang kuersetin sebanyak 10 mg dan dilarutkan dalam metanol p.a sebanyak 100 ml, sehingga dihasilkan larutan kuersetin 100 ppm. Kemudian dilakukan pengenceran berseri dengan mengambil 1; 2; 3; 4; dan 5 ml pada larutan induk dan ditambah metanol p.a 10 ml sehingga didapatkan konsentrasi 10, 20, 30, 40, dan 50 ppm. Selanjutnya masing-masing konsentrasi diambil 5 ml, kemudian ditambahkan 75 μL larutan NaNO_2 5% ditunggu selama 6 menit, kemudian ditambahkan 150 μL AlCl_3 10% secara perlahan dan ditunggu 5 menit, terakhir ditambahkan 0,5 ml NaOH 1 N. Selanjutnya larutan dianalisis menggunakan spektrofomoter UV-VIS dengan panjang gelombang 514 nm. Larutan blanko yang digunakan yaitu metanol.

7) Pembuatan Kurva Baku

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

8) Analisis Kadar Fenolik

Ekstrak etil asetat yang telah dipekatkan selama 3 hari, kemudian ditambahkan metanol sebanyak 0,5 ml pada semua perlakuan. Kemudian ditambahkan pereaksi folin ciocalteu 0,25 ml didiamkan selama 8 menit sambil dikocok, lalu ditambahkan Na_2CO_3 7% sebanyak 2 ml dan divortex selama 1 menit. Selanjutnya larutan dianalisis menggunakan spektrofotometer UV-VIS dengan panjang gelombang 760 nm (Chandra, *et al.*, 2014). 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 (Kate, 2014) :

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

9) Analisis Kadar Flavonoid

Ekstrak etil asetat yang telah dipekatkan selama 3 hari, kemudian ditambahkan metanol sebanyak 0,25 ml pada semua perlakuan, 37,5 μ L larutan NaNO₂ 5% ditunggu selama 6 menit, Kemudian ditambahkan 150 μ L AlCl₃ 10% secara perlahan dan ditunggu 5 menit, selanjutnya ditambahkan 0,25 ml NaOH 1 N dan terakhir ditambahkan aquades hingga volume menjadi 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:

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

3.6 Analisis Data

Data yang diperoleh adalah data kualitatif dan kuantitatif. Data kualitatif meliputi morfologi kalus yang berupa warna dan tekstur kalus dianalisis secara deskriptif. Data kuantitatif meliputi biomassa segar kalus, biomassa kering kalus dan kadar metabolit sekunder (fenolik dan flavonoid) yang dianalisis statistik menggunakan uji Homogenitas dan Normalitas. Apabila data terdistribusi normal maka dilakukan uji ANOVA (*Analysis of Variance*) satu arah (*One Way Anova*), kemudian dilakukan uji *Post Hoc* jika terdapat perbedaan. Namun, jika data tidak

terdistribusi normal dan homogen maka dilakukan Uji *Kruskal-Walis*. Apabila terdapat perbedaan data perlakuan pada Uji *Kruskal Walis* dilakukan uji lanjutan dengan Uji *Man-Whitney*.



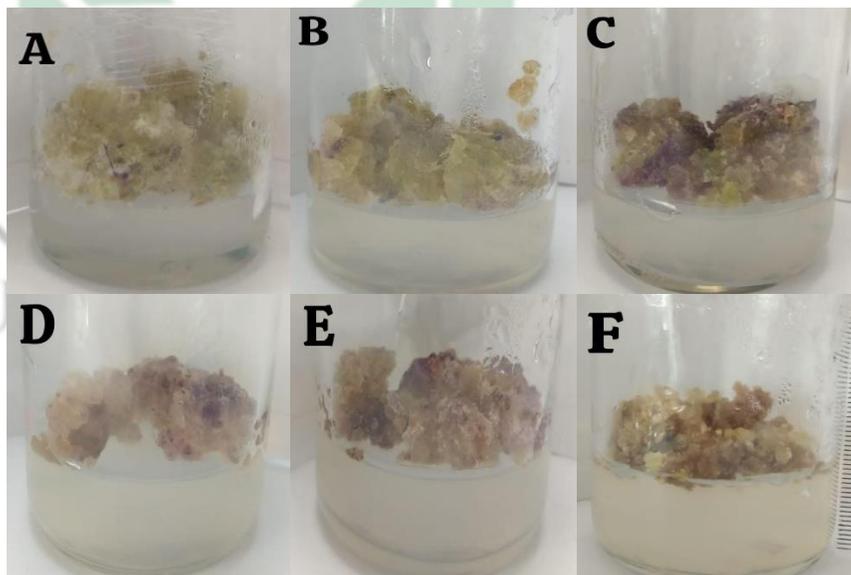
BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pengaruh Variasi Konsentrasi Sukrosa Terhadap Pertumbuhan Kalus Tanaman Paitan (*T. diversifolia*)

4.1.1 Pengaruh Variasi Konsentrasi Sukrosa Terhadap Warna dan Tekstur Kalus Tanaman Paitan (*T. diversifolia*)

Berdasarkan hasil dari pemberian variasi konsentrasi sukrosa pada media produksi kalus tanaman *T. diversifolia* yang berusia 6 minggu setelah subkultur ke-2 menunjukkan adanya respon yang bervariasi terhadap kalus tanaman *T. diversifolia*. Respon tersebut dapat diamati secara morfologi berupa warna dan tekstur kalus yang dapat dilihat pada gambar 4.1 dan tabel 4.1 dibawah ini.



Gambar 4.1 Kalus *T. diversifolia* hari ke-15 pada media subkultur produksi variasi konsentrasi sukrosa A= 30 g/L, B= 40 g/L, C= 50 g/L, D= 60 g/L, E= 70 g/L, F= 80g/L

Tabel 4.1 Pengaruh pemberian sukrosa terhadap warna dan tekstur Kalus

Konsentrasi (g/l)	Pengulangan	Warna	Tekstur
30 g/L	1	Hijau	Remah
	2	Hijau	Intermediet
	3	Putih Sedikit Kecoklatan	Remah
	4	Putih Sedikit Kecoklatan	Remah
	5	Putih Sedikit Kecoklatan	Remah
40 g/l	1	Hijau Kecoklatan	Remah
	2	Hijau Kecoklatan	Remah
	3	Coklat Keunguan	Intermediet
	4	Hijau Keunguan	Remah
	5	Hijau Keunguan	Remah
50 g/L	1	Kuning Kehijauan	Remah
	2	Kuning Kecoklatan	Intermediet
	3	kuning Keunguan	Remah
	4	kuning	Remah
	5	Coklat	Intermediet
60 g/L	1	kuning Keunguan	Remah
	2	Ungu Sedikit Kehijauan	Intermediet
	3	Kuning Kemerahan	Intermediet
	4	Coklat Keunguan	Remah
	5	kuning Keunguan	Remah
70 g/L	1	Kuning Keunguan	Remah
	2	Coklat	Intermediet
	3	Hijau keunguan	Remah
	4	Coklat Keunguan	Intermediet
	5	Coklat Keunguan	Intermediet
80 g/L	1	Hijau Kecoklatan	Remah
	2	Coklat sedikit Merah Muda	Kompak
	3	Coklat Keunguan	Intermediet
	4	Coklatan keputihan	Kompak
	5	Coklat	Intermediet

Sumber : Dokumen Pribadi, 2023

Terbentuknya kalus disebabkan adanya rangsang luka. Rangsang tersebut menyebabkan kesetimbangan pada dinding sel berubah arah, sebagian protoplas mengalir ke luar sehingga mulai terbentuk kalus. Kalus

terbentuk pada bagian eksplan yang terluka (potongan). Pemberian konsentrasi sukrosa membuat kalus yang terbentuk merata pada semua permukaan eksplan. Hal ini diduga karena pada media dengan penambahan sukrosa, sumber karbon dan energi didapatkan lebih banyak sehingga proses pembelahan sel- sel eksplan dan pembentukkan kalus maksimal.

Berdasarkan gambar 4.1 dan tabel 4.1, diketahui pada perlakuan 30 g/L dan 40 g/L menghasilkan kalus yang didominasi warna hijau. Namun kalus pada media dengan pemberian sukrosa 60 g/L hingga 80 g/L menunjukkan warna kalus yang cenderung berwarna kuning dan coklat yang disertai dengan warna gelap dibagian tepi kalus. Warna kalus yang berbeda pada setiap perlakuan menunjukkan bahwa kalus merespons perlakuan konsentrasi sukrosa yang diberikan. Warna kalus dapat menjadi indikator aktivitas pembelahan sel yang masih aktif terjadi atau telah mati (Rahmah *et al.*, 2020). Kalus pada perlakuan 30 g/L dan penambahan sukrosa 40 g/L memiliki warna hijau yang menunjukkan adanya kandungan klorofil dan merupakan kalus berkualitas baik yang aktif membelah (Yunita *et al.*, 2021).

Kalus pada perlakuan sukrosa 30 g/L dan 40 g/L cenderung berwarna kuning dan kecoklatan. Warna kuning pada kalus menunjukkan sel masih aktif membelah dan warna coklat muda menunjukkan bahwa sel aktif berdiferensiasi (Simbolon, 2017). Sedangkan kalus pada perlakuan sukrosa 40 g/L dan 50 g/L menunjukkan warna coklat dengan bagian tepi kalus yang gelap seperti kuning atau kemerahan, hal tersebut menunjukkan terjadinya

browning dan laju pembelahan sel yang rendah (Fitriani *et al.* , 2016). Browning juga terjadi pada bagian tepi kalus perlakuan sukrosa 50 g/L dan 60 g/L. Browning pada tepi kalus disebabkan oleh sel-sel bagian tepi kalus yang lebih cepat merespons perlakuan sukrosa yang diberikan, akibat permukaan sel yang berinteraksi secara langsung dengan media, dimana media merupakan sumber nutrisi, mineral dan oksigen yang lebih baik bagi sel kalus (Nasution, 2019).

Peningkatan konsentrasi sukrosa pada medium menunjukkan adanya respon berupa perbedaan warna pada kalus. Dimana peningkatan konsentrasi sukrosa pada media menyebabkan perbedaan tekanan osmotik intraseluler dan ekstraseluler yang memicu terjadinya permeabilisasi membran vakuolar (tonoplas). Hal tersebut menyebabkan senyawa fenolik dalam vakuola mengalir menuju sitosol. Interaksi antara senyawa fenolik dengan enzim polifenol oksidase (PPO), serta oksigen akan memicu oksidasi fenolik membentuk senyawa quinon. Quinon adalah senyawa yang sangat reaktif dan mudah bereaksi secara spontan dan non-spesifik dalam mempolimerisasi protein atau komponen seluler lain dan membentuk pigmentasi gelap (Li *et al.*, 2016). Browning pada kalus dapat menyebabkan penurunan laju pertumbuhan, penurunan kemampuan regeneratif dan bahkan kematian sel (Xie *et al.*, 2022).

Kalus yang dihasilkan pada penelitian ini memiliki warna coklat dengan warna yang lebih gelap seiring penambahan konsentrasi sukrosa yang diberikan. Hal tersebut selaras dengan penelitian Wahyuni *et al.*, (2020), di

mana kalus *Justica gendarusa* menunjukkan munculnya pencoklatan atau browning pada kalus, seiring peningkatan konsentrasi sukrosa. Pencoklatan juga ditemukan pada kalus *Glycyrrhiza inflata* pada variasi konsentrasi sukrosa Li *et al.*, (2016). Pemberian konsentrasi sukrosa yang lebih tinggi pada penelitian Fitriani *et al.*, (2016) juga membentuk pigmentasi kecoklatan pada media kalus *Colocasia esculenta* var. *antiquorum*. Selain itu, perubahan warna kalus menjadi kecoklatan dapat disebabkan oleh degradasi klorofil. Penggunaan sukrosa pada medium akan memenuhi kebutuhan gula dalam sel, sehingga aktivitas fotosintesis akan menurun dan berakibat pada terhambatnya pembentukan klorofil penelitian (Fitriani *et al.*, 2016) .

Berdasarkan tabel 4.1, diketahui pada perlakuan 30 dan 40 g/L menghasilkan kalus bertekstur remah (*friable*). Sedangkan kalus pada media dengan perlakuan sukrosa 50 g/L hingga 70 g/L menunjukkan kalus yang memiliki tekstur remah dan intermediet. Namun kalus dengan perlakuan sukrosa 80 g/L menunjukkan tekstur kalus yang cenderung intermediet dan kompak. Tekstur kalus yang berbeda pada setiap perlakuan menunjukkan bahwa kalus merespons perlakuan konsentrasi sukrosa yang diberikan. Tekstur kalus dapat menjadi indikator aktivitas pembelahan sel yang masih aktif terjadi atau telah mati (Rahmah *et al.*, 2020).

Tekstur yang rapuh terbentuk akibat pertumbuhan sel-sel dengan ukuran yang lebih kecil. Selain itu, tekstur kalus yang rapuh juga disebabkan karena tingginya kadar air pada sel kalus, kondisi sel kalus dengan ketersediaan air yang cukup membuat dinding sel kalus belum mengalami lignifikasi atau

pengerasan dinding sel. Sedangkan pada kondisi kalus yang tercekam akibat kekeringan, dinding sel kalus akan mengalami lignifikasi, kondisi ini bertujuan untuk menguatkan dinding sel dan permeabilitas, sehingga dapat membantu proses pengangkutan air dalam sel kalus (Yunita *et al.*, 2021).

Perlakuan kontrol dan penambahan konsentrasi sukrosa 40 g/L mampu untuk membentuk tekstur kalus yang remah. Kalus remah merupakan kalus yang paling baik. Kalus remah ialah kalus yang tumbuh terpisah-pisah menjadi bagian-bagian yang kecil, mudah lepas dan mengandung banyak air. Penelitian ini menunjukkan bahwa perlakuan 40 g/L sukrosa pada medium MS berpengaruh terhadap pembentukan kalus dengan tekstur kalus remah. Hasil tersebut sejalan dengan penelitian Kherasani *et al.*, (2017) di mana pada kultur *Zingiber officinale* menunjukkan hasil tekstur remah pada perlakuan konsentrasi sukrosa total pada media dari 20 g/L hingga 50 g/L.

Perlakuan sukrosa 40 g/L hingga 80 g/l mampu untuk membentuk tekstur intermediet. Kalus intermediet merupakan perpaduan antara kalus kompak dan kalus remah. Kalus intermediet merupakan kalus yang memasuki fase peralihan akibat adanya tekanan osmotik pada sel (Indah dan Ermavitalini, 2013). Sedangkan kalus kompak merupakan kalus mempunyai tekstur padat dan keras, yang tersusun dari sel-sel kecil yang sangat rapat. Kalus kompak merupakan kalus yang tersusun akibat dinding sel yang mengalami lignifikasi. Kalus kompak pada penelitian ini hanya terbentuk pada perlakuan 80 g/L. Tekstur yang rapuh terbentuk akibat pertumbuhan sel-sel dengan ukuran yang lebih kecil. Selain itu, tekstur kalus yang rapuh

juga disebabkan karena tingginya kadar air pada sel kalus, kondisi sel kalus dengan ketersediaan air yang cukup membuat dinding sel kalus belum mengalami lignifikasi atau pengerasan dinding sel. Sedangkan pada kondisi kalus yang tercekam akibat kekeringan, dinding sel kalus akan mengalami lignifikasi, kondisi ini bertujuan untuk menguatkan dinding sel dan permeabilitas, sehingga dapat membantu proses pengangkutan air dalam sel kalus (Yunita *et al.*, 2021). Menurut Fitri *et al.* (2012) Tekstur kompak pada kalus disebabkan karena terjadinya peristiwa lignifikasi. Lignifikasi merupakan proses pengerasan dinding sel pada tumbuhan yang disebabkan karena penumpukan lignin, dimana lignin merupakan senyawa metabolit sekunder turunan dari senyawa fenolik yang disintesis karena pengaruh cekaman osmotik karena pemberian konsentrasi sukrosa yang tinggi pada media.

Tekstur kalus dapat digunakan untuk menilai kualitas kalus. Tekstur kalus yang kompak baik karena mengakumulasi metabolit sekunder lebih banyak. Metabolit sekunder hanya dihasilkan oleh tumbuhan tertentu, sehingga tekstur kalus ini dipengaruhi oleh jenis eksplan yang digunakan (Fitriana *et al.*, 2019). Berdasarkan hasil tabel 4.1 taktur kalus yang dihasilkan berupa remah, intermediet dan kompak dikarenakan cekaman yang berupa perbedaan pemberian konsentrasi sukrosa pada media produksi (Sukma *et al.*, 2020).

4.1.2 Pengaruh Variasi Konsentrasi Sukrosa Terhadap Biomassa Kalus Tanaman Paitan (*T. diversifolia*)

Biomassa segar dan biomassa kering merupakan parameter pertumbuhan kalus yang diukur selama masa perlakuan 15 hari. Pertumbuhan ditunjukkan dari peningkatan biomassa segar pada kalus secara fisiologis yang mengandung air dan karbohidrat (Sari et al., 2018). Peningkatan biomassa segar diperoleh dari pengukuran biomassa segar kalus pada akhir masa perlakuan atau subkultur hari ke-15. Selain itu, pengukuran biomassa kering juga dilakukan pada akhir masa perlakuan. Berat kering diperoleh dengan cara mengeringkan kalus didalam oven sehingga menguapkan kandungan air pada kalus dan dilakukan pengukuran hingga diperoleh berat konstan.

A. Biomassa Segar Kalus

Biomassa segar kalus menjadi salah satu indikator untuk mengetahui adanya pertumbuhan masa sel melalui proses pembelahan dan pembesaran sel (Tonk *et al.*, 2016). Biomassa segar kalus Paitan (*T. diversifolia*) pada penelitian ini didapatkan dengan menimbang kalus yang telah tumbuh setelah masa inkubasi selama 15 hari. Data hasil dari rata-rata biomassa segar kalus dapat dilihat pada tabel 4.2

Tabel 4.2 Hasil Pengaruh Konsentrasi Sukrosa Terhadap Biomassa segar kalus

Konsentrasi (g/l)	Rata-rata Berat Segar \pm Standar deviasi (gr)	Sig.
30 g/L	1.58 \pm 0.08	0.000
40 g/L	2.10 \pm 0.09	
50 g/L	2.88 \pm 0.27	
60 g/L	2.54 \pm 0.14	
70 g/L	2.26 \pm 0.06	
80 g/L	1.96 \pm 0.06	

Sumber : Dokumen Pribadi, 2023

Berdasarkan nilai yang tertera pada tabel 4.2 diketahui bahwa nilai signifikansi $p (0,00) < \alpha (0,05)$ yang menunjukkan bahwa perlakuan penambahan konsentrasi sukrosa yang nyata terhadap kadar fenolik total pada kalus tanaman Paitan (*T. diversifolia*). Selanjutnya perlu dilakukan uji *Mann-Whitney* (tabel 4.3) menunjukkan bahwa terdapat pengaruh nyata pada kadar fenolik kalus tiap perlakuan karena nilai *Asymp. Sig. < 0,05*.

Tabel 4.3 Hasil Uji *Mann-Whitney* parameter rata-rata berat kering total tanaman Paitan (*T. diversifolia*).

Perlakuan	A	B	C	D	E	F
A						
B	0.009*					
C	0.009*	0.009*				
D	0.009*	0.009*	0.036*			
E	0.009*	0.027*	0.009*	0.009*		
F	0.009*	0.036*	0.009*	0.009*	0.009*	

Sumber : Dokumen Pribadi, 2023

Keterangan : A= 30 g/L, B= 40 g/L, C= 50 g/L, D= 60 g/L, E= 70 g/L, F= 80g/L

(*) = Tanda adanya perbedaan yang signifikan pada Uji *Mann-Whitney* (Sig. $p < \alpha (0.05)$).

Berdasarkan tabel 4.2, terlihat bahwa perlakuan yang menghasilkan biomassa segar pada kalus tanaman Paitan (*T. diversifolia*) paling besar adalah perlakuan konsentrasi sukrosa 50 g/L yang memiliki nilai rata-rata 2.88 gr. Sedangkan yang paling kecil adalah kalus pada perlakuan 30 g/L dengan nilai rata-rata 1.58 gr.

Berdasarkan hasil tabel Uji *Mann-Whitney* pada tabel 4.3, diketahui bahwa terdapat beberapa perbedaan perlakuan yang memiliki perbedaan yang signifikan. Seperti perlakuan kontrol (A) yang berbeda nyata dengan perlakuan B (Sig. $p = 0,009$), perlakuan C (Sig. $p = 0,009$), perlakuan D (Sig.

$p = 0,009$), perlakuan E (Sig. $p = 0,009$) dan perlakuan F (Sig. $p = 0,009$). Pada perlakuan B terdapat perbedaan nyata dengan perlakuan perlakuan C (Sig. $p = 0,009$), perlakuan D (Sig. $p = 0,009$), perlakuan E (Sig. $p = 0,027$) dan perlakuan F (Sig. $p = 0,036$). Pada pada perlakuan C terdapat perbedaan nyata dengan perlakuan D (Sig. $p = 0,036$), perlakuan E (Sig. $p = 0,009$) dan perlakuan F (Sig. $p = 0,009$). Pada pada perlakuan D terdapat perbedaan nyata dengan perlakuan E (Sig. $p = 0,009$) dan perlakuan F (Sig. $p = 0,009$). Sedangkan pada perlakuan E terdapat perbedaan nyata dengan perlakuan F (Sig. $p = 0,009$) Terdapat beberapa kalus yang mampu beradaptasi dengan kondisi cekaman sehingga hal ini berpengaruh pada berat kering kalus tanaman Paitan (*T. diversifolia*) dan menyebabkan perbedaan yang nyata antar perlakuan.

Hasil menunjukkan bahwa penambahan konsentrasi sukrosa sebesar 50 g/L merupakan konsentrasi optimal yang dapat mendukung pertumbuhan kalus, sedangkan penambahan konsentrasi sukrosa di atas 50 g/L menunjukkan penghambatan pertumbuhan pada kalus. Konsentrasi sukrosa di atas normal dapat memicu cekaman osmotik (Li et al., 2016). Penurunan berat segar kalus dapat terjadi karena adanya perbedaan kemampuan sel dalam menyerap dan menyimpan air (Rajput *et al.*, 2016).

Peningkatan konsentrasi sukrosa dalam medium menyebabkan perubahan pergerakan air melintasi membran sel, akibat adanya ketidakseimbangan osmolaritas antara cairan dalam sel dengan cairan di luar sel. Peningkatan konsentrasi sukrosa pada medium menyebabkan

penurunan potensial air pada medium yang dapat menghambat penyerapan air dan mineral oleh sel-sel pada kalus, serta memicu keluarnya air dari dalam sel, sehingga berpengaruh pada penurunan volume sitoplasma dan vakuola sel (Ghimire *et al.*, 2018). Penurunan potensial air medium menyebabkan turunnya turgor sel yang dapat menghambat pemanjangan dan pembelahan sel. Ketersediaan air dalam sel dapat menghambat proses pertumbuhan, karena berkurangnya kandungan air akan berpengaruh terhadap tekanan turgor dan menghambat kinerja hormon pertumbuhan, seperti auksin dan sitokinin. Konsentrasi sukrosa yang berlebihan menghambat pertumbuhan kalus karena stres osmotik dan defisiensi nutrisi (Wan *et al.*, 2015).

Penelitian ini menunjukkan bahwa konsentrasi sukrosa di atas 50 g/L pada medium MS berpengaruh terhadap penurunan pertumbuhan kalus, yang ditunjukkan oleh biomassa segar kalus yang mengalami penurunan, seiring tingginya konsentrasi sukrosa yang diberikan. Hasil tersebut sejalan dengan penelitian Elgirban *et al.*, (2012), di mana pada kultur *Morinda citrifolia* L. menunjukkan rerata biomassa segar terbaik pada konsentrasi sukrosa 50 g/L sebesar 5,2 gr, namun terjadi penurunan biomassa segar pada penambahan konsentrasi sukrosa di atas 50 g/L menjadi 4,5 gr pada konsentrasi 70 g/L dan 3,8 gr pada konsentrasi 90 g/L. Kalus *Billbergia zebrina* juga menghasilkan rerata biomassa segar terbaik pada konsentrasi sukrosa 50 g/L yaitu sebesar 2,965 gr (Khan *et al.*, 2018).

Penurunan pertumbuhan kalus pada perlakuan sukrosa di atas 50 g/L dapat disebabkan oleh kandungan sukrosa yang tinggi. Menurut Shofiyani *et al.*, (2020) Peningkatan sukrosa berlebih menyebabkan sel jenuh sehingga tekanan osmotik dalam media lebih tinggi daripada di dalam sel sehingga menurunkan pertumbuhan dan perkembangan sel. Lebih lanjut, sel akan mati karena plasmolisis. Sukrosa yang tinggi pada medium dapat menghasilkan kalus bertekstur kompak. Sukrosa memiliki peran dalam pembentukan dinding sel yang terdiri dari rantai selulosa yang sulit untuk diputuskan. Kalus yang terlalu kompak memiliki kemampuan penyerapan zat hara atau nutrisi yang lebih rendah, sehingga laju pertumbuhan kalus kurang optimal (Fitriana *et al.*, 2019).

B. Biomassa Kering Kalus

Biomassa kering kalus juga menjadi salah satu indikator untuk mengetahui adanya pertumbuhan melalui proses pembelahan dan pembesaran sel (Tonk *et al.*, 2016). Berat kering kalus juga menjadi parameter yang digunakan sebagai ukuran global tanaman dengan segala peristiwa dengan melakukan pengeringan untuk menghilangkan kadar air dan menghentikan aktivitas metabolisme sel hingga ditemukan berat yang konstan setelah penimbangan yang dilakukan secara berulang. Kalus tanaman Paitan (*T. diversifolia*) pada penelitian ini didapatkan dengan mengeringkan kalus pada oven dengan suhu 50 °C selama 48 jam. Data hasil dari rata-rata biomassa kalus dapat dilihat pada tabel 4.3

Tabel 4.4 Hasil Pengaruh Konsentrasi Sukrosa Terhadap Biomassa kering kalus

Konsentrasi (g/l)	Rata-rata ± Standar deviasi (gr)	Sig.
30 g/L	0.118 ± 0.013	0.000
40 g/L	0.146 ± 0.013	
50 g/L	0.257 ± 0.037	
60 g/L	0.224 ± 0.009	
70 g/L	0.216 ± 0.007	
80 g/L	0.204 ± 0.049	

Sumber : Dokumen Pribadi, 2023

Berdasarkan nilai yang tertera pada tabel 4.4 diketahui bahwa nilai signifikansi $p (0,00) < \alpha (0,05)$ yang menunjukkan bahwa perlakuan penambahan konsentrasi sukrosa yang nyata terhadap berat kering pada kalus tanaman Paitan (*T. diversifolia*). Selanjutnya perlu dilakukan uji *Mann-Whitney* (tabel 4.5) menunjukkan bahwa terdapat pengaruh nyata pada berat kering kalus tiap perlakuan karena nilai *Asymp. Sig. < 0,05*.

Tabel 4.5 Hasil Uji *Mann-Whitney* parameter rata-rata berat kering tanaman Paitan (*T. diversifolia*).

Berat Kering						
Perlakuan	A	B	C	D	E	F
A						
B	0.012*					
C	0.009*	0.009*				
D	0.009*	0.009*	0.248			
E	0.009*	0.009*	0.009*	0.009*		
F	0.009*	0.009*	0.009*	0.009*	0.117	

Sumber : Dokumen Pribadi, 2023

Keterangan : A= 30 g/L, B= 40 g/L, C= 50 g/L, D= 60 g/L, E= 70 g/L, F= 80g/L

(*) = Tanda adanya perbedaan yang signifikan pada Uji *Mann-Whitney* (Sig. $p < \alpha (0.05)$).

Berdasarkan tabel 4.4, terlihat bahwa perlakuan yang menghasilkan berat kering pada kalus tanaman Paitan (*T. diversifoia*) paling besar adalah perlakuan konsentrasi sukrosa 50 g/L yang memiliki nilai rata-rata 0.257 g.

Sedangkan yang paling kecil adalah kalus pada perlakuan 30 g/L dengan nilai rata-rata 0.118 g.

Berdasarkan hasil tabel Uji *Mann-Whitney* pada tabel 4.5, diketahui bahwa terdapat beberapa perbedaan perlakuan yang memiliki perbedaan yang signifikan. Seperti perlakuan kontrol (A) yang berbeda nyata dengan perlakuan B (Sig. $p = 0,012$), perlakuan C (Sig. $p = 0,009$), perlakuan D (Sig. $p = 0,009$), perlakuan E (Sig. $p = 0,009$) dan perlakuan F (Sig. $p = 0,009$). Pada perlakuan B terdapat perbedaan nyata dengan perlakuan D (Sig. $p = 0,009$). Sedangkan pada perlakuan C terdapat perbedaan nyata dengan perlakuan D (Sig. $p = 0,009$), perlakuan E (Sig. $p = 0,009$) dan perlakuan F (Sig. $p = 0,009$). Terdapat beberapa kalus yang mampu beradaptasi dengan kondisi cekaman sehingga hal ini berpengaruh pada berat kering kalus tanaman Paitan (*T. diversifolia*) dan menyebabkan perbedaan yang nyata antar perlakuan.

Hasil menunjukkan konsentrasi sukrosa sebesar 50 g/L merupakan konsentrasi optimal yang dapat mendukung pertumbuhan kalus, sedangkan penambahan konsentrasi sukrosa di atas 60 g/L menunjukkan penghambatan pertumbuhan pada kalus. Konsentrasi sukrosa di atas normal dapat memicu cekaman osmotik (Li *et al.*, 2016). Peningkatan berat kering kalus terjadi seiring dengan meningkatnya berat segar kalus. Namun pada konsentrasi di atas 50 g/L terjadi penurunan berat kering atau biomassa, hal tersebut terjadi karena konsentrasi sukrosa yang berlebihan dapat menghambat

pertumbuhan kalus karena stres osmotik dan defisiensi nutrisi (Wan *et al.*, 2015).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi sukrosa yang semakin tinggi tidak selalu menghasilkan berat kering kalus yang semakin tinggi pula. Hal ini disebabkan konsentrasi sukrosa yang terlalu tinggi dalam media akan menjadikan media lebih pekat dan menghambat penyerapan air maupun garam mineral yang ada (da Silva *et al.*, 2017). Menurut (Zahara *et al.*, 2017), sukrosa merupakan sumber karbon penting yang dapat mempengaruhi pertumbuhan dan biomassa sel. Sukrosa yang cukup dalam media menyebabkan pembelahan, pembesaran dan diferensiasi sel dengan berjalan baik. Ketersediaan sukrosa yang optimum dalam media memungkinkan terjadinya cukup energi serta bahan-bahan penting untuk pertumbuhan. Namun ketersediaan sukrosa yang terlalu besar dalam media juga dapat menghambat pertumbuhan sel. Sedangkan sukrosa dengan konsentrasi yang lebih rendah dapat mengurangi pertumbuhan kalus, hal ini disebabkan karena nutrisi yang tersedia pada media kultur akan lebih cepat habis.

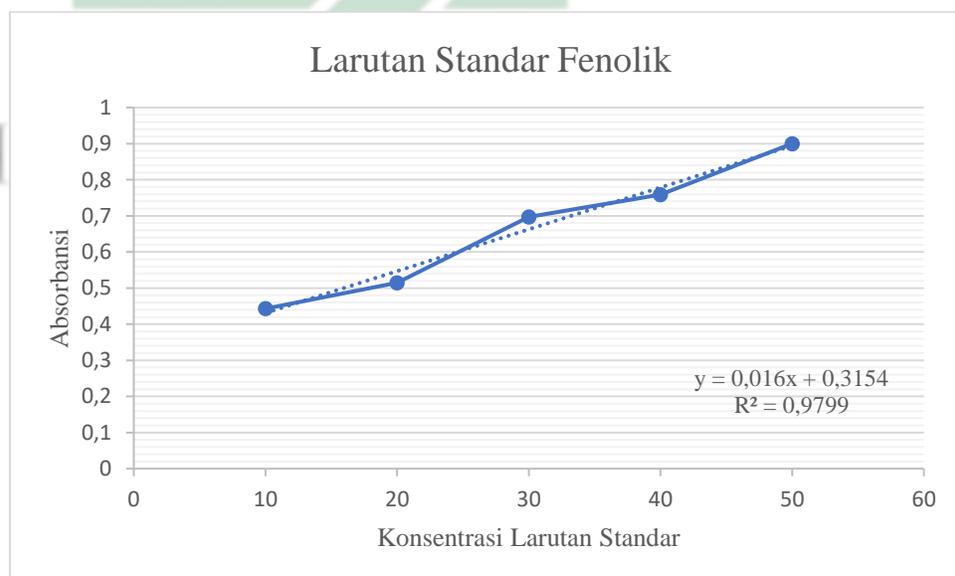
Penelitian ini menunjukkan bahwa konsentrasi sukrosa di atas 50 g/L pada medium MS berpengaruh terhadap penurunan pertumbuhan kalus, yang ditunjukkan oleh berat kering kalus yang mengalami penurunan, seiring tingginya konsentrasi sukrosa yang diberikan. Hasil tersebut sejalan dengan penelitian penelitian Ali *et al.*, (2016), di mana pada kultur *Artemisia absinthium* L. menunjukkan berat kering terbaik didapatkan pada perlakuan

konsentrasi sukrosa 50 g/L. Kalus *Morinda citrifolia* L. juga menghasilkan rerata biomassa segar terbaik pada konsentrasi sukrosa 50 g/L dan menurun pada konsentrasi diatas 50 g/L (Elgirban, *et al.*, 2012).

4.2 Pengaruh Konsentrasi Sukrosa Terhadap Kadar Senyawa Metabolit Sekunder Tanaman Paitan (*T. diversifolia*)

4.2.1. Pengaruh Konsentrasi Sukrosa Terhadap Kadar Senyawa Fenolik Tanaman Paitan (*T. diversifolia*)

Berdasarkan hasil spektrofotometer UV-Vis didapatkan nilai absorbansi larutan standar kuersetin pada masing-masing deret konsentrasi. Dari hasil nilai tersebut dilakukan pembuatan kurva kalibrasi (gambar 4.2). Kurva kalibrasi adalah perbandingan antara konsentrasi dengan nilai absorbansi. Semakin besar konsentrasinya, maka nilai absorbansinya juga semakin besar (Pratiwi *et al.*, 2020). Panjang Gelombang yang digunakan dalam uji kadar fenolik yaitu 760 nm.



Gambar 4.2 Kurva Larutan Standar Fenolik pada Panjang Gelombang 760 nm

Berdasarkan gambar 4.2 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 $y = 0,016x - 0,3154$. 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 kuersetin dalam ekstrak kalus tanaman Paitan (*T. diversifolia*). Data hasil dari rata-rata konsentrasi senyawa fenolik dan rata-rata kadar senyawa fenolik total pada kalus tanaman Paitan (*T. diversifolia*) dapat dilihat pada tabel 4.6

Tabel 4.6 Hasil Pengaruh Konsentrasi Sukrosa Terhadap Kadar Fenolik Total

Konsentrasi Sukrosa (g/L)	Fenolik (mg/ml)	Rata-rata Kadar Fenolik Total \pm Standar deviasi (mg GAE/g)	Sig.
30 g/L	63.216	3.22 \pm 0.11	0
40 g/L	103.330	5.27 \pm 0.10	
50 g/L	128.599	6.56 \pm 0.15	
60 g/L	117.433	5.99 \pm 0.25	
70 g/L	94.566	4.82 \pm 0.07	
80 g/L	80.266	4.29 \pm 0.38	
Daun tanaman induk	78.458		

Sumber : Dokumen Pribadi, 2023

Berdasarkan nilai yang tertera pada tabel 4.6 diketahui bahwa nilai signifikansi $p (0,00) < \alpha (0,05)$ yang menunjukkan bahwa perlakuan penambahan konsentrasi sukrosa yang nyata terhadap kadar fenolik total pada kalus tanaman Paitan (*T. diversifolia*). Selanjutnya perlu dilakukan uji *Mann-Whitney* (tabel 4.7) menunjukkan bahwa terdapat pengaruh nyata pada kadar fenolik kalus tiap perlakuan karena nilai *Asymp. Sig.* $< 0,05$.

Tabel 4.7 Hasil Uji *Mann-Whitney* parameter rata-rata kadar fenolik total tanaman Paitan (*T. diversifolia*).

Perlakuan	A	B	C	D	E	F
A						
B	0.009*					
C	0.009*	0.009*				
D	0.009*	0.009*	0.009*			
E	0.009*	0.016*	0.009*	0.009*		
F	0.009*	0.009*	0.009*	0.009*	0.117*	

Sumber : Dokumen Pribadi, 2023

Keterangan : A= 30 g/L, B= 40 g/L, C= 50 g/L, D= 60 g/L, E= 70 g/L, F= 80g/L

(*) = Tanda adanya perbedaan yang signifikan pada Uji *Mann-Whitney* (Sig. $p < \alpha$ (0.05)).

Berdasarkan tabel 4.6, terlihat bahwa perlakuan yang menghasilkan kadar fenolik total pada kalus tanaman Paitan (*T. diversifolia*) paling besar adalah perlakuan konsentrasi sukrosa 50 g/L yang memiliki nilai rata-rata 6.56 mg GAE/g. Sedangkan kadar fenolik total yang paling kecil adalah kalus pada perlakuan 30 g/L dengan nilai rata-rata 3.22 mg GAE/g.

Berdasarkan hasil tabel Uji *Mann-Whitney* pada tabel 4.7, diketahui bahwa terdapat beberapa perbedaan perlakuan yang memiliki perbedaan yang signifikan. Seperti perlakuan kontrol (A) yang berbeda nyata dengan perlakuan C (Sig. $p = 0,016$), perlakuan D (Sig. $p = 0,009$), perlakuan E (Sig. $p = 0,009$) dan perlakuan F (Sig. $p = 0,009$). Pada perlakuan B terdapat perbedaan nyata dengan perlakuan D (Sig. $p = 0,009$). Pada perlakuan C terdapat perbedaan nyata dengan perlakuan D (Sig. $p = 0,009$). Pada perlakuan D terdapat perbedaan nyata dengan perlakuan E (Sig. $p = 0,009$) dan perlakuan F (Sig. $p = 0,009$). Sedangkan pada perlakuan E terdapat perbedaan nyata dengan perlakuan F (Sig. $p = 0,117$) Terdapat beberapa kalus yang mampu beradaptasi dengan kondisi cekaman sehingga hal ini

berpengaruh pada kadar fenolik total tanaman Paitan (*T. diversifolia*) dan menyebabkan perbedaan yang nyata antar perlakuan.

Peningkatan konsentrasi sukrosa di atas 30 g/L (kontrol) bertujuan untuk menginduksi cekaman osmotik pada sel-sel kalus. Cekaman merupakan salah satu efektor dalam peningkatan produksi metabolit sekunder, termasuk senyawa golongan fenolik dan flavonoid. Ketika mengalami cekaman, metabolisme primer akan beralih ke metabolisme sekunder untuk produksi senyawa metabolit sekunder, sehingga terjadi hambatan pertumbuhan sel kalus. Keberadaan metabolit sekunder berperan penting dalam pertahanan dan adaptasi terhadap cekaman. Metabolit sekunder berperan sebagai antioksidan dan komponen penguat dinding sel selama cekaman (Yang *et al.*, 2018).

Kandungan fenol total tertinggi dihasilkan pada media kultur dengan konsentrasi sukrosa 50 g/L. Konsentrasi sukrosa yang ditambahkan ke dalam media dapat mempengaruhi kandungan fenolik pada kultur kalus *T. diversifolia* ini. Hal ini berkaitan dengan jalur biosintesis golongan fenolik menggunakan sukrosa sebagai senyawa awal dalam jalur biosintesisnya. Jalur pembentukan melalui jalur asam shikimat berkaitan langsung dengan enzim percabangan antara metabolit primer dan sekunder yang disebut enzim *Phenylalanine Ammonia Lyase* (PAL). Hal ini sependapat dengan Taiz dan Zeiger (2010) bahwa pembentukan metabolit sekunder golongan fenolik tidak lepas dari peran enzim *Phenylalanine Ammonia Lyase* (PAL) dimana enzim ini berfungsi sebagai titik kontrol dalam pembentukan

metabolit sekunder. Enzim PAL merupakan enzim biosintetik yang merupakan kunci pada tahap pertama dalam proses pembentukan berbagai senyawa polifenol dan terlibat dalam mekanisme pertahanan.

Cekaman yang ditimbulkan oleh peningkatan konsentrasi sukrosa yakni berupa cekaman osmotik, dimana sel akan mengalami kekeringan yang dapat menimbulkan plasmolisis pada sel. Semakin tinggi konsentrasi sukrosa mengalami penurunan kandungan fenol total disebabkan efek inhibisi, dimana sukrosa dengan konsentrasi tinggi tidak lagi mendukung pertumbuhan kalus. Penambahan sukrosa berlebih dalam media mengakibatkan cekaman osmotik. Sel akan mempertahankan diri dengan mekanisme penyetaraan osmotik dan menghasilkan osmolit berupa gula, protein atau senyawa lain agar sel tidak mengalami plasmolisis. (Shofiyani *et al.*, 2020). Sehingga pada pemberian sukrosa dengan konsentrasi diatas 50 g/l pada penelitian ini mengalami penurunan kadar fenolik total pada sel kalus. Hasil tersebut sejalan dengan penelitian Ali *et al.*, (2016), di mana pada kultur *Artemisia absinthium* L. menunjukkan produksi kadar fenolik total terbaik terjadi pada penambahan konsentrasi sukrosa total 50 g/L yaitu sebesar $48,25 \pm 0,35$ mg/l dan mengalami penurunan pada konsentrasi 70 g/L menjadi $30,79 \pm 0,42$ mg/l.

Penambahan sukrosa dengan konsentrasi diatas 50 g/L dalam media mengakibatkan cekaman osmotik yang lebih tinggi. Sehingga sel akan mempertahankan diri dengan mekanisme penyetaraan osmotik dan menghasilkan osmolit berupa gula, protein atau senyawa lain seperti lignin

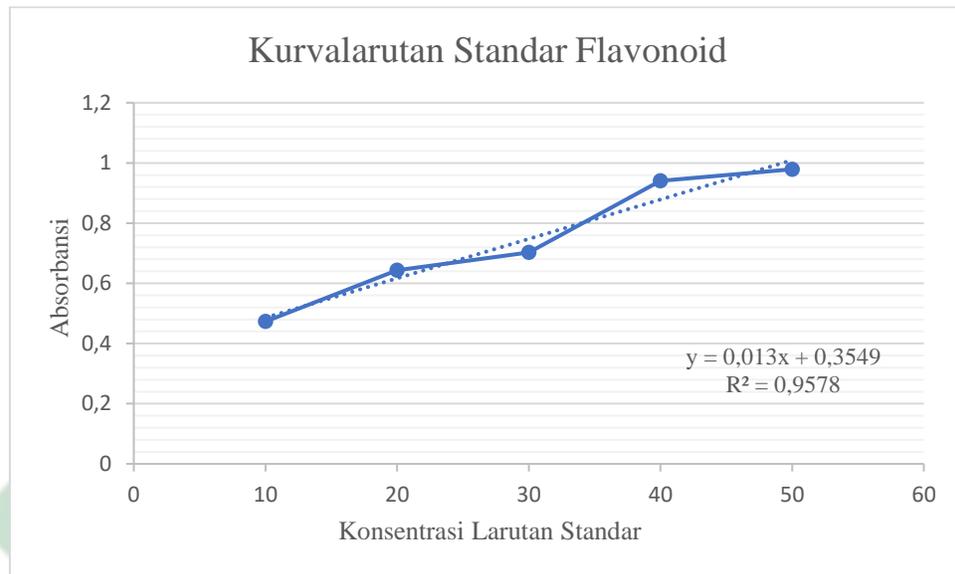
agar sel tidak mengalami plasmolisis. (Shofiyani *et al.*, 2020). Menurut Fitri *et al.* (2012) Tekstur kompak pada kalus disebabkan karena terjadinya peristiwa lignifikasi. Lignifikasi merupakan proses penguatan dinding sel pada tumbuhan yang disebabkan karena penumpukan lignin, dimana lignin merupakan senyawa metabolit sekunder turunan dari senyawa fenolik yang disintesis karena pengaruh cekaman osmotik karena pemberian konsentrasi sukrosa yang tinggi pada media. Kemunculan browning pada kalus dengan intensitas yang semakin meningkat, seiring tingginya konsentrasi sukrosa juga menunjukkan bahwa terdapat akumulasi senyawa fenolik selama cekaman berlangsung. Senyawa fenolik juga memiliki aktivitas antioksidan sebagai mekanisme pertahanan terhadap cekaman (Valifard *et al.*, 2014).

Berdasarkan tabel 4.6, konsentrasi fenolik kalus *T. diversifolia* pada media produksi 30 g/L sukrosa lebih rendah dari pada konsentrasi fenolik pada daun tanaman induk. Rendahnya konsentrasi pada kalus pada media produksi diduga dapat disebabkan karena kurang tepatnya waktu dan lama dan konsentrasi sukrosa 30 g/L yang kurang optimum untuk mensintesis senyawa fenolik (Pandiangan, 2011).

4.2.2 Pengaruh Konsentrasi Sukrosa Terhadap Kadar Senyawa Flavonoid Kalus Tanaman Paitan (*T. diversifolia*)

Berdasarkan hasil spektrofotometer UV-Vis didapatkan nilai absorbansi larutan standar kuersetin pada masing-masing deret konsentrasi. Dari hasil nilai tersebut dilakukan pembuatan kurva kalibrasi (gambar 4.3). Kurva kalibrasi adalah perbandingan antara konsentrasi dengan nilai absorban.

Semakin besar konsentrasinya, maka nilai absorbannya juga semakin besar (Pratiwi et al., 2020). Panjang Gelombang yang digunakan dalam uji kadar flavonoid yaitu 514 nm.



Gambar 4.3 Kurva Larutan Standar Kuersetin pada Panjang Gelombang 514 nm

Berdasarkan gambar 4.3 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 $y = 0,013x - 0,3549$.

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 Paitan (*T. diversifolia*). Data hasil dari rata-rata kadar senyawa flavonoid total dan konsentrasi flavonoid pada kalus tanaman Paitan (*T. diversifolia*) dapat dilihat pada tabel 4.8

Tabel 4.8 Hasil Pengaruh Konsentrasi Sukrosa Terhadap Konsentrasi dan Kadar Flavonoid total

Konsentrasi Sukrosa (g/L)	Fenolik (mg/ml)	Rata-rata Kadar Fenolik Total \pm Standar deviasi (mg GAE/g)	Sig.
30 g/L	63.216	3.22 \pm 0.11	0
40 g/L	103.330	5.27 \pm 0.10	
50 g/L	128.599	6.56 \pm 0.15	
60 g/L	117.433	5.99 \pm 0.25	
70 g/L	94.566	4.82 \pm 0.07	
80 g/L	80.266	4.29 \pm 0.38	
Daun tanaman induk	78.458		

Sumber : Dokumen Pribadi, 2023

Berdasarkan nilai yang tertera pada tabel 4.8 diketahui bahwa nilai signifikansi $p (0,00) < \alpha (0,05)$ yang menunjukkan bahwa perlakuan penambahan konsentrasi sukrosa yang nyata terhadap kadar flavonoid total pada kalus tanaman Paitan (*T. diversifolia*). Selanjutnya perlu dilakukan uji *Mann-Whitney* (tabel 4.9) menunjukkan bahwa terdapat pengaruh nyata pada kadar fenolik kalus tiap perlakuan karena nilai *Asymp. Sig. < 0,05*.

Tabel 4.9 Hasil Uji *Mann-Whitney* parameter rata-rata kadar flavonoid total tanaman Paitan (*T. diversifolia*).

Perlakuan	A	B	C	D	E	F
A						
B	0.009*					
C	0.009*	0.009*				
D	0.009*	0.009*	0.009*			
E	0.009*	0.009*	0.009*	0.009*		
F	0.009*	0.009*	0.009*	0.009*	0.009*	

Sumber : Dokumen Pribadi, 2023

Keterangan : A= 30 g/L, B= 40 g/L, C= 50 g/L, D= 60 g/L, E= 70 g/L, F= 80g/L

(*) = Tanda adanya perbedaan yang signifikan pada Uji *Mann-Whitney* (Sig. $p < \alpha (0.05)$).

Berdasarkan tabel 4.8, penelitian pada kalus *T. diversifolia* dengan pemberian konsentrasi sukrosa sebanyak 60 g/L menjadi perlakuan yang

menghasilkan kadar flavonoid total paling tinggi yakni 2.07 ± 0.07 mg QE/g. Sedangkan kadar flavonoid total terendah dihasilkan pada pemberian konsentrasi sukrosa 30 g/L sebesar 0.55 ± 0.03 mg QE/g.

Berdasarkan hasil tabel Uji *Mann-Whitney* pada tabel 4.9, diketahui bahwa terdapat beberapa perbedaan perlakuan yang memiliki perbedaan yang signifikan. Seperti perlakuan kontrol (A) yang berbeda nyata dengan perlakuan C (Sig. $p = 0,009$), perlakuan D (Sig. $p = 0,009$), perlakuan E (Sig. $p = 0,009$) dan perlakuan F (Sig. $p = 0,009$). Pada perlakuan B terdapat perbedaan nyata dengan perlakuan D (Sig. $p = 0,009$). Pada perlakuan C terdapat perbedaan nyata dengan perlakuan D (Sig. $p = 0,016$). Pada perlakuan D terdapat perbedaan nyata dengan perlakuan E (Sig. $p = 0,009$) dan perlakuan F (Sig. $p = 0,009$). Sedangkan pada perlakuan E terdapat perbedaan nyata dengan perlakuan F (Sig. $p = 0,009$) Terdapat beberapa kalus yang mampu beradaptasi dengan kondisi cekaman sehingga hal ini berpengaruh pada kadar fenolik total tanaman Paitan (*T. diversifolia*) dan menyebabkan perbedaan yang nyata antar perlakuan.

Peningkatan konsentrasi sukrosa bertujuan untuk menginduksi cekaman osmotik pada sel-sel kalus. Cekaman merupakan salah satu efektor dalam peningkatan produksi metabolit sekunder, termasuk senyawa golongan fenolik dan flavonoid. Ketika mengalami cekaman, metabolisme primer akan beralih ke metabolisme sekunder untuk produksi senyawa metabolit sekunder, sehingga terjadi hambatan pertumbuhan sel kalus. Keberadaan metabolit sekunder berperan penting dalam pertahanan dan adaptasi

terhadap cekaman. Metabolit sekunder berperan sebagai antioksidan dan komponen penguat dinding sel selama cekaman (Sari *et al.*, 2018).

Penelitian pada kalus *T. diversifolia* dengan pemberian sukrosa sebanyak 60 g/L menjadi perlakuan yang menghasilkan kadar flavonoid total paling tinggi. Hal ini karena pemberian konsentrasi sukrosa yang melebihi kadar normal diduga dapat menjadi cekaman yang akan berpengaruh pada jalur biosintesis metabolit sekunder khususnya flavonoid. Wink (2010) menyatakan bahwa penambahan elisitor seperti sukrosa difungsikan untuk merangsang aktivitas enzim *Phenylalanine Ammonia Lyase* (PAL) yang terlibat dalam jalur biosintesis sehingga dapat meningkatkan produksi metabolit sekunder. Sukrosa pada media kultur jaringan selain sebagai sumber karbon juga berfungsi sebagai regulator osmotik. Perubahan konsentrasi sukrosa dapat mengakibatkan berubahnya potensial osmotik pada lingkungan kultur. Perlakuan sukrosa 60 g/L menghasilkan kandungan flavonoid tertinggi diduga kalus berada pada kondisi stres karena tingginya tekanan osmotik. Menurut De Paiva *et al.* (2003), sukrosa dengan konsentrasi yang tinggi dapat menurunkan nilai potensial osmotik sehingga kondisi tanaman menjadi tercekam. Kondisi tercekam akan menghasilkan respon berupa perubahan biokimia pada sel tanaman, salah satunya adalah produksi metabolit sekunder.

Flavonoid merupakan metabolit sekunder yang masuk dalam kelompok fenolik yang terbentuk melalui jalur asam shikimat dan asam malonat, dimana bahan utama untuk kedua jalur tersebut adalah hasil glikolisis dari

karbohidrat. Hal ini sesuai dengan Held dan Piechulla (2011), bahwa pembentukan metabolit sekunder menggunakan tiga komponen hasil glikolisis yaitu glukosa 6-fosfat, fosfoenol piruvat, dan piruvat. Ketiganya memiliki peran masing-masing dalam pembentukan metabolit sekunder fenolat khususnya flavonoid. Sukrosa selain sebagai sumber karbon dan energi dalam pembentukan metabolit sekunder juga berfungsi mengatur sinyal yang mempengaruhi ekspresi gen dalam proses pembentukan metabolit sekunder. Konsentrasi sukrosa yang ditambahkan ke dalam media dapat mempengaruhi kandungan flavonoid pada kultur kalus *T. diversifolia* ini. Hal ini berkaitan dengan jalur biosintesis flavonoid yang termasuk golongan fenol, yang menggunakan sukrosa sebagai senyawa awal dalam jalur biosintesisnya. Jalur pembentukan melalui jalur asam shikimat berkaitan langsung dengan enzim percabangan antara metabolit primer dan sekunder yang disebut enzim *Phenylalanine Ammonia Lyase* (PAL) (Julianti *et al.*, 2021). Hal ini sependapat dengan Taiz dan Zeiger (2010) bahwa pembentukan metabolit sekunder golongan fenolik tidak lepas dari peran enzim *Phenylalanine Ammonia Lyase* (PAL) dimana enzim ini berfungsi sebagai titik kontrol dalam pembentukan metabolit sekunder. Enzim PAL merupakan enzim biosintetik yang merupakan kunci pada tahap pertama dalam proses pembentukan berbagai senyawa polifenol dan terlibat dalam mekanisme pertahanan.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan konsentrasi sukrosa 60 g/L pada media menghasilkan kandungan flavonoid tertinggi. Hal ini

disebabkan karena pada sukrosa 60 g/L merupakan konsentrasi yang optimal untuk aktivasi enzim PAL, sehingga menghasilkan produksi flavonoid yang lebih rendah. Sedangkan sukrosa dengan konsentrasi diatas 60 g/L adalah perlakuan yang dapat menurunkan aktivasi enzim PAL. Oleh karena itu, pemberian sukrosa eksogen dalam media dengan konsentrasi 30 g/L hingga 60 g/L merupakan konsentrasi terbaik untuk produksi flavonoid. Hasil tersebut sejalan dengan penelitian Ali *et al.*, (2016), di mana pada kultur *Artemisia absinthium* L. menunjukkan produksi kadar flavonoid total terbaik terjadi pada penambahan konsentrasi sukrosa total 70 g/L yaitu sebesar 12.71 mg/L, namun pada penambahan konsentrasi sukrosa total 90 g/L mengalami penurunan kadar flavonoid total yakni sebesar 5.06 mg/L. Kalus *Billbergia zebrina* juga menghasilkan rerata kadar flavonoid total terbaik pada konsentrasi sukrosa 45 g/L dan menurun pada konsentrasi 60 g/L (Martins *et al.*, 2015).

Berdasarkan tabel 4.8, konsentrasi flavonoid pada kalus *T. diversifolia* lebih rendah dari pada konsentrasi flavonoid pada daun tanaman induk. Rendahnya konsentrasi pada kalus pada media produksi diduga dapat disebabkan karena kurang tepatnya waktu dan lama penambahan sukrosa. Menurut Pandiangan (2011) menyatakan bahwa penggunaan elisitor seperti sukrosa untuk meningkatkan kandungan metabolit sekunder secara optimal dipengaruhi oleh konsentrasi sukrosa, waktu penambahan sukrosa, dan pertumbuhan sel dalam kultur. Penambahan sukrosa dalam kultur jaringan hingga mencapai konsentrasi optimal dapat mempengaruhi akumulasi

senyawa metabolit sekunder. Hal ini disebabkan karena sukrosa 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 sukrosa yang optimal untuk mengetahui produksi flavonoid yang optimum pada kultur kalus *T. diversifolia*.

Peningkatan kadar flavonoid total pada konsentrasi sukrosa 30 g/L hingga 60 g/L disebabkan karena senyawa flavonoid dapat berperan sebagai inhibitor alfa amilase dan alfa glukosidase yang dapat memperbaiki dan mencegah kerusakan sel akibat peristiwa oksidatif oleh radikal bebas. Hal ini karena memiliki aktivitas antioksidan dengan cara menangkap atau menetralkan radikal bebas terkait dengan gugus OH fenolik (Pratiwi, 2018). Flavonoid pada tanaman memiliki peranan sebagai pertahanan sel, penguatan bentuk asal sel sehingga sel tanaman tidak mengalami plasmolysis ketika terjadi cekaman osmotik (Abdillah, 2015). Namun pada penambahan sukrosa dengan konsentrasi diatas 60 g/L dalam media mengakibatkan cekaman osmotik yang lebih tinggi. Sehingga sel akan mempertahankan diri dengan mekanisme penyetaraan osmotik dan menghasilkan osmolit berupa gula, protein atau senyawa lain seperti lignin agar sel tidak mengalami plasmolisis. (Shofiyani *et al.*, 2020).

Hasil uji kandungan metabolit sekunder menunjukkan bahwa kalus tanaman paitan (*T. diversifolia*) menghasilkan kadar fenolik tertinggi sebesar 6.56 ± 0.15 mg GAE/g dan kadar flavonoid total tertinggi sebesar

2.07 ± 0.07 mg GAE/g. Fenolik dan flavonoid sendiri memiliki beberapa manfaat diantaranya untuk melindungi struktur sel, meningkatkan efektifitas vitamin C, antiinflamasi, mencegah keropos tulang, dan sebagai antibiotik (Haris, 2011). Hadits riwayat Imam Muslim dari Jabir bin Abdillah bahwa Nabi Muhammad SAW. bersabda:

لِكُلِّ دَاءٍ دَوَاءٌ فَإِذَا أُصِيبَ دَوَاءُ الدَّاءِ بَرَأَ بِإِذْنِ اللَّهِ عَزَّ وَجَلَّ

Artinya: “Setiap penyakit ada obatnya. Maka bila obat itu mengenai penyakitnya akan sembuh dengan seijin Allah Azza wa Jalla” (H.R. Muslim No 4084).

Berdasarkan hadist diatas menjelaskan bahwa Allah SWT menurunkan suatu penyakit kepada makhlukNya dan juga menciptakan obat bagi penyakit tersebut. Allah SWT. juga telah memberikan rasa sakit kepada manusia dan juga memberikan kesembuhan bagi orang yang sakit atas kehendakNya. Salah satu obat yang dapat menyembuhkan penyakit yaitu berasal dari tanaman yang dicipitakanNya. Manusia dapat memanfaatkan tanaman tersebut sebagai obat, sebagaimana dalam penelitian ini menggunakan tanaman paitan (*T. diversifolia*) yang memiliki berbagai manfaat untuk dijadikan sebagai obat tradisional seperti Abses, obat malaria hematoma, nyeri otot, obat luka, infeksi kulit di India, obat diabetes, obat malaria dan sebagai penangkal gigitan ular (Omokhua *et al.*, 2018).

Hasil metaboli sekunder yang baik tidak terlepas dari peran media kultur. Media bagi suatu tanaman merupakan kebutuhan utama untuk tumbuh yang didalamnya mengandung unsur hara makro maupun mikro.

Sedangkan dalam penelitian ini media tanam yang digunakan berupa agar yang diberi formulasi nutrisi sesuai dan identik dengan media tanaman (tanah) pada umumnya. Allah SWT berfirman dalam surat Al- A'raf ayat 58 sebagai berikut:

وَالْبَلَدُ الطَّيِّبُ يَخْرِجُ نَبَاتَهُ بِإِذْنِ رَبِّهِ وَالَّذِي خَبثَ لَا يَخْرِجُ إِلَّا نَكِدًا كَذَلِكَ
نُصَرِّفُ الْآيَاتِ لِقَوْمٍ يَشْكُرُونَ ٥٨

Artinya : *Tanah yang baik, tanaman-tanamannya tumbuh subur seizin Tuhannya. Adapun tanah yang tidak subur, tanaman-tanamannya hanya tumbuh merana. Demikianlah Kami jelaskan berulang kali tanda-tanda kebesaran (Kami) bagi orang-orang yang bersyukur.*

Ayat tersebut menjelaskan bahwa segala macam tumbuhan dapat tumbuh dengan baik apabila tanahnya subur. Sedangkan tanah yang buruk adalah tanah yang tidak subur. Menurut tafsir Ibnu Katsir - tanah yang subur yakni tanah yang baik yang mengeluarkan tumbuhan dengan cepat dan subur. Sehubungan dengan makna ayat di atas bahwa tanah yang subur merupakan tanah mengandung unsur hara makro dan mikro yang cukup.

Ayat di atas menjelaskan tanah merupakan Dengan seizin Allah SWT tanaman tersebut dapat hidup dengan media tanaman atau eksplan dapat tumbuh dengan baik apabila berada pada suatu keadaan atau lingkungan yang mendukung.

Dibalik pentingnya media MS dan zat pengatur tumbuh untuk pertumbuhan eksplan tanaman ternyata pada kultur jaringan masih ada faktor lain yang mempengaruhi pertumbuhan eksplan yakni sumber energi tanaman yang berupa sukrosa. Kebutuhan tanaman akan sumber karbon

berbeda-beda. Hal ini telah dituliskan dalam Al-Qur'an surah Al-Qamar ayat 49 sebagai berikut:

إِنَّا كُلَّ شَيْءٍ خَلَقْنَاهُ بِقَدَرٍ

Artinya: *Sesungguhnya Kami menciptakan segala sesuatu sesuai dengan ukuran.*

Menurut tafsir Ibnu Katsir dalam ayat di atas dijelaskan bahwa — Allah SWT telah menciptakan segala sesuatu menurut ukurannya. Seperti halnya pada penelitian ini, dalam penelitian ini menggunakan 6 macam konsentrasi sukrosa yang dikombinasikan agar mendapat suatu komposisi media MS yang paling efektif untuk pertumbuhan kalus. Dengan media pertumbuhan yang sesuai, kalus tanaman paitan (*T. diversifolia*) akan dapat tumbuh dengan optimal.

Sebagai seorang khalifah manusia memiliki tugas mengelola alam seoptimal mungkin. Selain itu manusia diciptakan untuk menjadi penguasa yang mengatur apa yang ada di bumi, seperti tumbuhan, hewan, hutan, air, sungai, gunung, laut dan lain sebagainya yang seyogyanya manusia harus mampu memanfaatkan segala apa yang ada di bumi ini untuk kemaslahatannya.

Hasil penelitian ini menunjukkan kebesaran dan kekuasaan Allah SWT bahwa calon batang yang ditanam pada media yang sesuai akan membentuk kalus dan berdeferensiasi membentuk tanaman yang utuh. Dari hasil tersebut Allah SWT telah menunjukkan tahapan kehidupan sebuah tanaman. Maha

Suci Allah atas segala kekuasaan dan kebesaran-Nya, semoga dapat menjadi pelajaran bagi kita sebagai khalifah untuk semakin mendekatkan diri kepada Allah SWT.

Allah SWT menciptakan segala sesuatu dengan sempurna. Sehingga apabila di pelajari lebih lanjut dapat diketahui bahwa teknik kultur jaringan khususnya teknik kultur kalus terdapat kelebihan dan kekurangan. Karena teknik kultur kalus tanaman paitan (*T. diversifolia*) ini merupakan hasil pemikiran manusia sehingga terdapat kekurangan. Namun demikian, hasil pemikiran ini juga mempunyai manfaat tersendiri yaitu sebagai salah satu alternatif untuk meningkatkan produksi metabolit sekunder pada tanaman paitan (*T. diversifolia*) melalui cekaman biotik yang lebih aman. Ini merupakan bentuk anugerah akal yang diberikan oleh Allah SWT kepada manusia agar selalu bersyukur atas nikmat dan karunia.

Diharapkan dari hasil penelitian ini dapat memberikan informasi kepada para pelajar, mahasiswa dan peneliti bahwa dengan kultur jaringan dapat meningkatkan biomassa dan produksi metabolit sekunder lebih cepat dengan hasil yang banyak dan tidak tergantung musim.

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa:

1. Pemberian konsentrasi sukrosa pada media produksi memiliki pengaruh yang signifikan terhadap pertumbuhan kalus. Warna kalus yang dihasilkan hijau, coklat kegelapan seperti ungu dan merah dengan tekstur remah, intermediet dan kompak. Nilai rata-rata berat segar dan biomassa kering kalus tertinggi terdapat pada perlakuan pemberian sukrosa pada konsentrasi 50 g/L yaitu dengan rata-rata sebesar 2.88 ± 0.27 gr berat segar dan 0.257 ± 0.037 gr berat kering.
2. Pemberian konsentrasi sukrosa pada media produksi berpengaruh terhadap kadar fenolik dan flavonoid total ekstrak kalus tanaman Paitan, kadar fenolik total tertinggi pada perlakuan pemberian sukrosa pada konsentrasi 50 g/L yaitu sebesar 6.56 ± 0.15 mg *GAE*/gr. Sedangkan kadar flavonoid total tertinggi pada perlakuan pemberian sukrosa pada konsentrasi 60 g/L yaitu sebesar 2.07 ± 0.07 mg *QE*/gr.

5.2 Saran

1. Diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai pengaruh penambahan konsentrasi sukrosa terhadap pertumbuhan biomassa kalus dan kandungan senyawa fenolik dan flavonoid kalus tanaman Paitan dengan menggunakan konsentrasi sukrosa yang lebih bervariasi.

2. Diperlukan penelitian dengan menggunakan media kultur cair untuk membandingkan pengaruh konsentrasi sukrosa pada produksi metabolit sekunder. Analisis mengenai pengaruh konsentrasi sukrosa dalam meningkatkan senyawa metabolit sekunder dengan menggunakan standar senyawa dan metode uji yang berbeda pada kalus tanaman Paitan juga perlu dilakukan guna mendapatkan hasil yang lebih baik.



DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah (2003) *Tafsir Ibnu Katsir Jilid 6-7, International Journal of Hypertension*.
- Abdillah, Dede. 2015. Pengaruh Cekaman Kekeringan Terhadap Kandungan Fenolik dan Antioksidan Tanaman Sorgum (*Sorghum bicolor* L. Moench) Pada Fase Awal Vegetatif. *Skripsi*
- Afolayan, F. I. D. *et al.* (2016) 'Antimalarial actions of Lawsonia inermis, Tithonia diversifolia and Chromolaena odorata in combination', *Journal of Ethnopharmacology*, 191, pp. 188–194. doi: 10.1016/j.jep.2016.06.045.
- Agbede, T. M., Adekiya, A. O. and Ogeh, J. S. (2013) 'Archives of Agronomy and Soil Science Response of soil properties and yam yield to Chromolaena odorata (Asteraceae) and Tithonia diversifolia (Asteraceae) mulches', *Archives of Agronomy and Soil Science*, 60(2), pp. 209–224. doi: 10.1080/03650340.2013.780127.
- Ahmad, A. R., Juwita, J. and Ratulangi, S. A. D. (2015) 'Penetapan Kadar Fenolik dan Flavonoid Total Ekstrak Metanol Buah dan Daun Patikala (Etlingera elatior (Jack) R.M.SM)', *Pharmaceutical Sciences and Research*, 2(1), pp. 1–10. doi: 10.7454/psr.v2i1.3481.
- Ali, M. *et al.* (2016) 'Sucrose-enhanced biosynthesis of medicinally important antioxidant secondary metabolites in cell suspension cultures of Artemisia absinthium L .', *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 39(12), pp. 1945–1954. doi: 10.1007/s00449-016-1668-8.
- Ali, M. and Abbasi, B. H. (2014) 'Light-induced fluctuations in biomass accumulation, secondary metabolites production and antioxidant activity in cell suspension cultures of Artemisia absinthium L.', *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 140, pp. 223–227. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2014.08.008.
- Amanatie (2015) 'Tithonia', *Westcott's Plant Disease Handbook*, 23(4), pp. 1111–1111. doi: 10.1007/978-1-4020-4585-1_2668.
- Aminah, A., Tomayahu, N. and 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), pp. 226–230. doi: 10.33096/jffi.v4i2.265.
- Ananda Lutfiah, N. A. H. (2022) 'Indonesian Journal of Mathematics and Natural Sciences', *Indonesian Journal of Mathematics and Natural Sciences*, 45(1), pp. 1–8.
- Ang, A. M. G. *et al.* (2019) 'Antioxidant and Cytotoxic Activity of the Leaf Ethanolic Extracts of Tithonia diversifolia and Gliricidia sepium from Bukidnon, Philippines', *Asian Journal of Biological and Life Sciences*, 8(1), pp. 08–15. doi: 10.5530/ajbls.2019.8.2.

Anwar, N. and Isda, M. N. (2021) 'Respons Pembentukan Kalus Daun Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urb.) dengan Penambahan Naphtalene Acetic Acid dan Benzyl Amino Purin Secara In Vitro', *Biota : Jurnal Ilmiah Ilmu-Ilmu Hayati*, 5(2), pp. 136–142. doi: 10.24002/biota.v5i3.3232.

Azwana, A., Mardiana, S. and Zannah, R. R. (2019) 'Efikasi insektisida nabati ekstrak bunga kembang bulan (*Tithonia diversifolia* A. Gray) terhadap hama ulat grayak (*Spodoptera litura* F.) pada tanaman sawi di laboratorium', *Biolink*, 5(2), pp. 131–141. Available at: <http://ojs.uma.ac.id/index.php/biolink>.

Barboza, B. R. *et al.* (2018) 'Phytochemical bioprospecting, antioxidant, antimicrobial and cytotoxicity activities of saline extract from *Tithonia diversifolia* (Hemsl) A. Gray leaves', *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 8(5), pp. 245–253. doi: 10.4103/2221-1691.233005.

Borowitzka, M. A. (2018) 'The "stress" concept in microalgal biology—homeostasis, acclimation and adaptation', *Journal of Applied Phycology*, 30(5), pp. 2815–2825. doi: 10.1007/s10811-018-1399-0.

Cahyaningsih, R., Magos Brehm, J. and Maxted, N. (2021) 'Gap analysis of Indonesian priority medicinal plant species as part of their conservation planning', *Global Ecology and Conservation*, 26, p. e01459. doi: 10.1016/j.gecco.2021.e01459.

Cheyrier, V. *et al.* (2013) 'Plant phenolics : Recent advances on their biosynthesis , genetics , and ecophysiology Plant Physiology and Biochemistry Plant phenolics : Recent advances on their biosynthesis , genetics , and ecophysiology', *Plant Physiology et Biochemistry*, (April 2018). doi: 10.1016/j.plaphy.2013.05.009.

De Paiva, V. B. and W.C. Otoni, 2003. Carbon Sources and Their Osmotic Potential in Plant Tissue Culture: Does It Matter? *Sci Hort*, 97: 193-2-2.

Desyrakhmawati, L. *et al.* (2015) 'Pertumbuhan *Tithonia diversifolia* dengan Dosis Pupuk Kandang dan Jarak Tanam yang Berbeda', *Jurnal Agronomi Indonesia (Indonesian Journal of Agronomy)*, 43(1), p. 72. doi: 10.24831/jai.v43i1.9595.

Dewantara, L. A. R., Ananto, A. D. and Andayani, Y. (2021) 'Penetapan Kadar Fenolik Total Ekstrak Kacang Panjang (*Vigna unguiculata*) dengan Metode Spektrofotometri UV-Visible', *Lambung Farmasi: Jurnal Ilmu Kefarmasian*, 2(1), p. 102. doi: 10.31764/lf.v2i1.3759.

Dhifo Indratama dan Yenita (2019) 'Vol 1 No 1 Desember 2019 ARTIKEL PENELITIAN UJI EFEKTIVITAS ANTIBIOTIK EKSTRAK DAUN BELIMBING WULUH SECARA IN VITRO Jurnal Pandu Husada Fakultas Kedokteran (FK) Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara (UMSU) Vol 1 No 1 Desember 2019 Jurnal Pandu Husad', 1(1), pp. 61–65.

Dian Simbolon, R. I. M. D. dan R. (2017) 'Karakteristik Kalus Beberapa Varietas Kedelai (*Glycine max* (L.) Merill) dengan Pemberian 2,4D dan Kinetin pada Kondisi Hipoksia Secara In Vitro', *Jurnal Agroekoteknologi FP USU*, 5(4), pp. 837–847.

Dwi, P. I. (2017) 'diversifolia (Hemsley) A . Gray) SEBAGAI PESTISIDA NABATI SAWI (Brassica juncea L .) Crocidolomia binotalis Pest Control on Mustard Greens Plants', *PLANTROPICA Journal of Agricultural Science*, 2(2), pp. 498–504.

Edreva, A. *et al.* (2008) 'Stress-Protective Role of Secondary Metabolites : Diversity of Functions and Mechanisms', 34(1–2), pp. 67–78.

Elgirban, A., Lee, E. and Paek, K. (2012) 'Sucrose regulated enhanced induction of anthraquinone , phenolics , flavonoids biosynthesis and activities of antioxidant enzymes in adventitious root suspension cultures of Morinda citrifolia (L .)', *Acta Physiol Plant*, 34(2), pp. 405–415. doi: 10.1007/s11738-011-0837-2.

Erawati, D. N., Fisdiana, U. and Humaida, S. (2018) 'Peran Benzyl Amino Purine Pada Induksi Tunas Kultur Tembakau White Burley', *Jurnal Ilmiah Inovasi*, 17(3), pp. 127–131. doi: 10.25047/jii.v17i3.553.

Fauzy, E., Mansyur and Husni, A. (2016) 'Pengaruh Penggunaan Media Murashoge dan Skoog (Ms) dan Vitamin terhadap Tekstur, Warna dan Berat Kalus Rumput Gajah (Pennisetum purpureum) CV. Hawaii Pasca Radiasi Sinar Gamma pada Dosis LD50 (In Vitro)', *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), pp. 1689–1699.

Fazal, H., Haider, B. and Nisar, A. (2015) 'Sucrose induced osmotic stress and photoperiod regimes enhanced the biomass and production of antioxidant secondary metabolites in shake-flask suspension cultures of Prunella vulgaris L .', *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 124(3), pp. 573–581. doi: 10.1007/s11240-015-0915-z.

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.

Fitriana, D. *et al.* (2019) 'Effect of combination explant difference leaf part and concentration of active charcoal on callus initiation mangrove (*Rhizophora Apiculata* BI) by in-vitro', *Journal of Physics: Conference Series*, 1217(1), pp. 1–7. doi: 10.1088/1742-6596/1217/1/012166.

Fitriani, H., Aryaningrum, P. D. and Hartati, N. S. (2016) 'Proliferation of embryogenic callus of Satoimo taro (*Colocasia esculenta* var. antiquorum) in culture media with various levels of sucrose and gelling agent', *Nusantara Bioscience*, 8(2), pp. 316–320. doi: 10.13057/nusbiosci/n080230.

Galindo, V. *et al.* (2017) 'Facilitation by pioneer shrubs for the ecological restoration of riparian forests in the Central Andes of Colombia', *Restoration Ecology*, 25(5), pp. 731–737. doi: 10.1111/rec.12490.

Gama, R. M. da *et al.* (2014) 'Phytochemical screening and antioxidant activity of ethanol extract of *Tithonia diversifolia* (Hemsl) A. Gray dry flowers', *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(9), pp. 740–742. doi: 10.12980/APJTB.4.2014APJTB-2014-0055.

Ghimire, B. K. *et al.* (2018) 'Establishment of culturing conditions and assessment of antioxidant activity and somaclonal variation in the adventitious root suspension cultures of *Oplopanax elatus* Nakai', *Acta Physiologiae Plantarum*, 40(3), pp. 1–19. doi: 10.1007/s11738-018-2625-8.

Held, H.W. and B. Piechulla. 2011. *Plant Biochemistry*. Elsevier, London.

Herbivores, D. A. (2018) 'Plant Secondary Metabolites and Their General Function in Plants', pp. 3–17. doi: 10.1007/978-3-319-99546-5.

HERIANSYAH, P. (2019) 'MULTIPLIKASI EMBRIO SOMATIS TANAMAN ANGGREK (*Dendrobium* sp) DENGAN PEMBERIAN KINETIN DAN SUKROSA SECARA IN-VITRO', *Jurnal Ilmiah Pertanian*, 15(2), pp. 67–78. doi: 10.31849/jip.v15i2.1974.

Ikalinus, R., Widyastuti, S. and Eka Setiasih, N. (2015) 'Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Kulit Batang Kelor (*Moringa Oleifera*)', *Indonesia Medicus Veterinus*, 4(1), p. 77.

Indah, P. N. and Ermavitalini, D. (2013) 'Induksi kalus daun nyamplung (*Calophyllum inophyllum* Linn.) pada beberapa kombinasi konsentrasi 6-Benzylaminopurine (BAP) dan 2,4-Dichlorophenpxyacetic Acid (2,4-D)', *Jurnal Sains dan Seni Pomits*, 2(1), pp. 1–6.

Indrajaya, Y. *et al.* (2022) *Tropical Forest Landscape Restoration in Indonesia: A Review*, *Land*. doi: 10.3390/land11030328.

Isah, T. *et al.* (2017) 'Secondary metabolism of pharmaceuticals in the plant in vitro cultures : strategies , approaches , and limitations to achieving higher yield', *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 0(0), p. 0. doi: 10.1007/s11240-017-1332-2.

Jan, R. *et al.* (2020) 'Modulation of sugar and nitrogen in callus induction media alter PAL pathway, SA and biomass accumulation in rice callus', *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 143(3), pp. 517–530. doi: 10.1007/s11240-020-01938-8.

John-Dewole, J.-D. (2013) 'Phytochemical and Antimicrobial Studies of Extracts from the Leaves of *Tithonia Diversifolia* for Pharmaceutical Importance', *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 6(4), pp. 21–25. doi: 10.9790/3008-0642125.

Julianti, R. F., Nurchayati, Y. and Setiari, N. (2021) 'Produksi Flavonoid Pada Kalus Tomat (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Secara In Vitro Dalam Medium MS Dengan Konsentrasi Sukrosa Yang Berbeda', *Metamorfosa: Journal of Biological Sciences*, 8(1), p. 141. doi: 10.24843/metamorfosa.2021.v08.i01.p15.

Khan, T. *et al.* (2018) 'Industrial Crops & Products Carbohydrate-induced biomass accumulation and elicitation of secondary metabolites in callus cultures of *Fagonia indica*', *Industrial Crops & Products*, 126(June), pp. 168–176. doi: 10.1016/j.indcrop.2018.10.023.

Kherasani, I. *et al.* (2017) 'Buletin Anatomi dan Fisiologi Volume 2 Nomor 1 Februari

2017 Pertumbuhan Kalus Eksplan Rimpang Jahe Merah (*Zingiber officinale* Rosc .) pada Berbagai Konsentrasi Sukrosa Secara In Vitro The Growth Callus of Red Ginger (*Zingiber officinale* Rosc .) Explant', *Buletin Anatomi dan Fisiolgi*, 2(1), pp. 43–49.

Kokou, K., Afiademyo, K. M. and Agboyi, L. K. (2021) 'Invasive Alien Species in Togo (West Africa)', *Invasive Alien Species*, 1(Kokutse 2002), pp. 291–312. doi: 10.1002/9781119607045.ch10.

Kurmukov, A. G. (2013) 'Phytochemistry of medicinal plants', *Medicinal Plants of Central Asia: Uzbekistan and Kyrgyzstan*, 1(6), pp. 13–14. doi: 10.1007/978-1-4614-3912-7_4.

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), pp. 57–65. doi: 10.18860/elha.v4i2.2627.

Latief, M. F., Karti, P. and Prihantoro, I. (2018) 'Daya Tumbuh Kalus Lamtoro Varietas Tarramba Hasil Iradiasi Sinar Gamma 40 Gray yang Toleran Asam pada Media 2,4-D', *Buletin Makanan Ternak*, 16(1), pp. 36–46. doi: <https://journal.ipb.ac.id/index.php/bulmater/issue/viewIssue/1985/85>.

Leandro, A. *et al.* (2020) 'Seaweed Phenolics: From Extraction to Applications', *Marine Drugs*, 18(8), pp. 1–47.

Lestari, S. A. D. (2016) 'Pemanfaatan paitan sebagai pupuk organik pada tanaman kedelai', *Iptek Tanaman Pangan*, 11(1), pp. 49–56.

Li, Y. *et al.* (2016) 'Study on enzymatic browning in suspension cultures of licorice cells', *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 30(2), pp. 277–283. doi: 10.1080/13102818.2015.1114906.

Lin, D. *et al.* (2016) 'An overview of plant phenolic compounds and their importance in human nutrition and management of type 2 diabetes', *Molecules*, 21(10). doi: 10.3390/molecules21101374.

Liu, Y. H., Offler, C. E. and Ruan, Y. L. (2016) 'Cell wall invertase promotes fruit set under heat stress by suppressing ROS-independent cell death', *Plant Physiology*, 172(1), pp. 163–180. doi: 10.1104/pp.16.00959.

Luković, M. and Nićiforović, J. (2021) 'Increased Demands for Natural Immuno-Boosters in Selected Tourism Areas', *Tourism International Scientific Conference Vrnjačka Banja-TISC*, 19(Tisc), pp. 366–381. doi: 10.52370/tisc21366ml.

Mahadi, I., Syafi'i, W. and Sari, Y. (2016) 'Callus Induction of Calamansi (*Citrus microcarpa*) Using 2,4-D and BAP Hormones by in vitro Methods', *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*, 21(2), pp. 84–89. doi: 10.18343/jipi.21.2.84.

Małgorzata Brodowska, K. (2017) 'Natural flavonoids: classification, potential role, and application of flavonoid analogues', *European Journal of Biological Research*,

7(2), pp. 108–123.

Mamdouh, D. (2022) ‘Optimization of Callus and Cell Suspension Cultures of *Lycium schweinfurthii* for Improved Production of Phenolics , Flavonoids , and Antioxidant Activity’, *Horticulturae*, 8(5), pp. 1–17.

Manurung, B. H., Damanik, R. I. and Bayu, E. S. (2018) ‘Kombinasi 2,4 D Dan BAP Untuk Induksi Kalus Embriogenik Beberapa Varietas Kedelai (*Glycine Max* (L.) Merrill) Pada Kondisi Hipoksia Secara In Vitro’, *Jurnal Agroteknologi*, 6(1), pp. 86–92.

Martins, J. P. R. *et al.* (2015) ‘Effects of salts and sucrose concentrations on in vitro propagation of *Billbergia zebrina* (Herbert) Lindley (Bromeliaceae)’, *Australian Journal of Crop Science*, 9(1), pp. 85–91.

Meigaria, I Wayan Mudianta, N. W. M. (2016) ‘1 SKRINING FITOKIMIA DAN UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK ASETON DAUN KELOR (MORINGA OLEIFERA) Komang Mirah’, *Jurnal Wahana Matematika dan Sains*, 10(1), pp. 1–11.

Modarres, M., Esmailzadeh Bahabadi, S. and Taghavizadeh Yazdi, M. E. (2018) ‘Enhanced production of phenolic acids in cell suspension culture of *Salvia leriifolia* Benth. using growth regulators and sucrose’, *Cytotechnology*, 70(2), pp. 741–750. doi: 10.1007/s10616-017-0178-0.

Moriyama, U. *et al.* (2016) ‘Aluminum effect on starch, soluble sugar, and phytohormone in roots of *Quercus serrata* Thunb. seedlings’, *Trees - Structure and Function*, 30(2), pp. 405–413. doi: 10.1007/s00468-015-1252-x.

Mujeeb, M. (2017) ‘Effect of Carbon Source and Incubation Temperature on Total Content of Secondary Metabolites of Callus Culture of *Solanum Nigrum*’, *World Journal of Pharmaceutical Research*, 6(8), pp. 905–922. doi: 10.20959/wjpr20178-7306.

Murcia, G. *et al.* (2017) ‘ABA and GA3 regulate the synthesis of primary and secondary metabolites related to alleviation from biotic and abiotic stresses in grapevine’, *Phytochemistry*, 135, pp. 34–52. doi: 10.1016/j.phytochem.2016.12.007.

Narayani, M. and Srivastava, S. (2017) ‘Elicitation: a stimulation of stress in in vitro plant cell/tissue cultures for enhancement of secondary metabolite production’, *Phytochemistry Reviews*, 16(6), pp. 1227–1252. doi: 10.1007/s11101-017-9534-0.

Nasution, N. H. and Nasution, I. W. (2019) ‘The Effect of Plant Growth Regulators on Callus Induction of Mangosteen (*Garcinia mangostana* L.)’, *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 305(1). doi: 10.1088/1755-1315/305/1/012049.

Nurika, F. B. P., Wiryani, E. and Jumari (2019) ‘Keanekaragaman Vegetasi Riparian Sungai Panjang Bagian Hilir di Kecamatan Ambarawa Kabupaten Semarang’, *Jurnal Akademika Biologi*, 8(1), pp. 30–34. Available at:

<https://ejournal3.undip.ac.id/index.php/biologi/article/view/24742>.

Nurokhman, A. *et al.* (2018) 'concentration and immersion frequency on biomass and flavonoid production of *Gynura procumbens* (Lour.) Merr callus culture in temporary immersion bioreactor', *Books.Uinsby.Ac.Id*, 6(12), pp. 748–754. doi: 10.21276/sajb.2018.6.12.2.

Ojo, O. A. *et al.* (2018) 'HPLC-DAD fingerprinting analysis, antioxidant activities of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray leaves and its inhibition of key enzymes linked to Alzheimer's disease', *Toxicology Reports*, 5, pp. 585–592. doi: 10.1016/j.toxrep.2018.05.003.

Omokhua, A. G. *et al.* (2018) 'A comprehensive study of the potential phytomedicinal use and toxicity of invasive *Tithonia* species in South Africa 06 Biological Sciences 0605 Microbiology', *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 18(1), pp. 1–15. doi: 10.1186/s12906-018-2336-0.

Omolola, T. O. (2019) 'Phytochemical, Proximate and Elemental Composition of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray leaves', *International Annals of Science*, 8(1), pp. 54–61. doi: 10.21467/ias.8.1.54-61.

De Paiva Neto, V. B. and Otoni, W. C. (2003) 'Carbon sources and their osmotic potential in plant tissue culture: Does it matter?', *Scientia Horticulturae*, 97(3–4), pp. 193–202. doi: 10.1016/S0304-4238(02)00231-5.

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*.

Paramita, O. *et al.* (2022) 'Optimalisasi Jenis Pelarut Pada Perwarna Kulit Ubi Ungu', *Inovasi Kimia*, (1), pp. 222–252. doi: 10.15294/ik.v1i1.81.

PEBRA HERIANSYAH, TRINOP SAGIARTI, R. (2014) 'Pengaruh Pemberian Myoinositol dan Arang Atif pada Media Subkultur Jaringan Tanaman Anggrek (*Dendrobium* sp.)', *Jurnal Agroteknologi*, 5(1), pp. 9–16.

'Pemanfaatan kandungan metabolit sekunder pada tanaman kunyit dalam mendukung peningkatan pendapatan masyarakat Utilization of secondary metabolite in the turmeric plant to increase community income' (2018) *Kultivasi*, 17(1), pp. 544–549.

Pereira, D. M. *et al.* (2009) 'Phenolics: From chemistry to biology', *Molecules*, 14(6), pp. 2202–2211. doi: 10.3390/molecules14062202.

Pratiwi, Nur Sela. 2018. Gambaran Kadar Vitamin C Pada Buah Ciplukan (*Physalis Angulata* L.) (Studi Di Desa Candi Mulyo Kabupaten Jombang). *Skripsi*.

Priska, M. *et al.* (2018) 'REVIEW : ANTOSIANIN DAN PEMANFAATANNYA', 6, pp. 79–97.

Puspita sari, N., Iman Santoso, T. and Mawardi, S. (2013) 'Distribution of Soil Fertility

of Smallholding Arabica Coffee Farms at Ijen-Raung Highland Areas Based on Altitude and Shade Trees’, *Pelita Perkebunan (a Coffee and Cocoa Research Journal)*, 29(2), pp. 93–107. doi: 10.22302/iccri.jur.pelitaperkebunan.v29i2.57.

Putri, L. (2017) ‘Penentuan Konsentrasi Senyawa Berwarna KMnO₄ Dengan Metoda Spektroskopi UV Visible’, *Natural Science Journal*, 3(1), pp. 391–398.

Rahardian, T. S., Sumarni, T. and Suryanto, A. (2017) ‘PEMANFAATAN PUPUK HIJAU PAITAN (*Tithonia diversifolia*) DAN KRINYU (*Chromolaena odorata*) DALAM PENINGKATAN HASIL TANAMAN BROKOLI (*Brassica oleracea*)’, *PLANTROPICA Journal of Agricultural Science*, 2(2), pp. 108–116.

Rahayu, S.- and Suharyanto, S. (2020) ‘INDUKSI KALUS DENGAN 2,4D DAN BAP PADA EKSPAN DAUN VEGETATIF DAN GENERATIF TEMPUYUNG (*Sonchus arvensis* L.)’, *BioEksakta : Jurnal Ilmiah Biologi Unsoed*, 2(3), p. 479. doi: 10.20884/1.bioe.2020.2.3.3677.

Rahmah, M., Anwar, A. and Swasti, E. (2020) ‘Karamunting (*Rhodomyrtus tomentosa*) Callus Induction In Vitro’, *International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology*, 5(2), pp. 459–465. doi: 10.22161/ijeab.52.20.

Rajput, V. D. *et al.* (2016) ‘A review on salinity adaptation mechanism and characteristics of *Populus euphratica*, a boon for arid ecosystems’, *Shengtai Xuebao*, 36(6), pp. 497–503. doi: 10.1016/j.chnaes.2016.08.001.

Rasud, Y. and 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), pp. 67–72. doi: 10.18343/jipi.25.1.67.

Rinawati, R., Suharyanto, E. and Wijayanti, N. (2019) ‘Pengaruh Ekstrak Rebusan Daun *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray Terhadap Kadar Glukosa Darah’, *BIOTIK: Jurnal Ilmiah Biologi Teknologi dan Kependidikan*, 7(1), p. 41. doi: 10.22373/biotik.v7i1.5470.

Riwanti, P., Izazih, F. and Amaliyah, A. (2018) ‘Pengaruh Perbedaan Konsentrasi Etanol pada Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etanol 50,70 dan 96% *Sargassum polycystum* dari Madura’, *Journal of Pharmaceutical-care Anwar Medika*, 2(2), pp. 35–48. doi: 10.36932/jpcam.v2i2.1.

Rondang Tambun *et al.* (2017) ‘Pengaruh Ukuran Partikel, Waktu Dan Suhu Pada Ekstraksi Fenol Dari Lengkuas Merah’, *Jurnal Teknik Kimia USU*, 5(4), pp. 53–56. doi: 10.32734/jtk.v5i4.1555.

Rudin, N. A. (2020) ‘Pengaruh Cekaman Abiotik Terhadap Ekspresi Gen Dan Konsentrasi Metabolit Sekunder Pada *Catharanthus roseus*’, *Jurnal Pro-Life: Jurnal Pendidikan Biologi, Biologi, dan Ilmu Serumpun*, 7(3), pp. 262–274. Available at: <http://ejournal.uki.ac.id/index.php/prolife/article/view/2344>.

Sahetapy, M. (2015) ‘Induksi Kalus Hipokotil Brokoli Pada Media Ms yang Diberi

2,4-D', *Jurnal Ilmiah UNKLAB*, 19(1), pp. 1–11.

sariyem (2015) 'EFEKTIFITAS EKSTRAK DAUN SUKUN HASIL PEREBUSAN TERHADAP PERTUMBUHAN KOLONI BAKTERI STREPTOCOCCUS MUTANS Sariyem ¹, Sadimin ², Lanny Sunarjo ³, Makhyatun Haniyati ⁴', 02(2).

Satria, R., Hakim, A. R. and Darsono, P. V. (2022) 'Penetapan Kadar Flavonoid Total Dari Fraksi n-Heksana Ekstrak Daun Gelinggang dengan Metode Spektrofotometri UV-Vis', *Journal of Engineering, Technology, and Applied Science*, 4(1), pp. 33–46. doi: 10.36079/lamintang.jetas-0401.353.

Shofiyan, A. and Pratikna, A. M. P. dan L. (2020) 'PENGARUH JENIS MEDIA DAN KONSENTRASI SUKROSA TERHADAP PRODUKSI', *SEMNAS LPPM*, pp. 656–661.

Silalahi, M. (2019) 'KENCUR (*Kaempferia galanga*) DAN BIOAKTIVITASNYA', *Jurnal Pendidikan Informatika dan Sains*, 8(1), p. 127. doi: 10.31571/saintek.v8i1.1178.

da Silva, F. J. *et al.* (2017) 'In vitro cultivation of purple basil *Ocimum basilicum* L. "red rubin" at different levels of salts, charcoal, sucrose and potassium iodine', *Australian Journal of Crop Science*, 11(9), pp. 1137–1145. doi: 10.21475/ajcs.17.11.09.pne624.

Sirait, J. and Simanihuruk, K. (2021) 'Utilization of *Tithonia diversifolia* as Ruminant Feed', *Indonesian Bulletin of Animal and Veterinary Sciences*, 31(3), p. 137. doi: 10.14334/wartazoa.v31i3.2876.

Solfaine, R., Hamid, I. S. and Muniroh, L. (2021) 'Antioxidative Activity of *Tithonia Diversifolia* Extract in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats.', *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 913(1). doi: 10.1088/1755-1315/913/1/012087.

Sukma, K. P. W. *et al.* (2020) 'Callus response of hybrid and Madura local corn to salt stress', *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 457(1), pp. 1–5. doi: 10.1088/1755-1315/457/1/012077.

Susanti (2016) 'Perbandingan Metode Ekstraksi Maserasi dan Refluks terhadap Kadar Fenolik dari Ekstrak Tongkol Jagung (*Zea mays* L.) (Susanty, Fairus Bachmid)', *Konversi*, 5(2), pp. 87–93.

Susi, S. (2019) 'IDENTIFIKASI KOMPONEN ISOFLAVONOID PADA BUAH BALANGKASUA (*Lepisanthes alata* (Blume) Leenh.)', *Ziraa'Ah Majalah Ilmiah Pertanian*, 44(2), p. 205. doi: 10.31602/zmip.v44i2.1935.

Taiz, L. and E. Zeiger. 2010. *Plant Physiology* (fifth edition). Massachusetts: Sinauer

Tiwari, R. (2015) 'Plant secondary metabolites : a review Plant secondary metabolites : a review', (October).

Tonk, D. *et al.* (2016) '*Aspergillus flavus* fungus elicitation improves vincristine and

vinblastine yield by augmenting callus biomass growth in *Catharanthus roseus*'. doi: 10.1007/s11240-016-0998-1.

Wahyuni, D. K. *et al.* (2020) 'Effects of light, sucrose concentration and repetitive subculture on callus growth and medically important production in *Justicia gendarussa* Burm.f.', *Biotechnology Reports*, 27, p. e00473. doi: 10.1016/j.btre.2020.e00473.

WAHYUNINGSIH, MAE SRI HARTATI, MAHARDIKA AGUS WIJAYANTI, ARIEF BUDIYANTO, M. H. (2015) 'Isolation and identification of potential cytotoxic compound from kembang bulan [*tithonia diversifolia* (Hemsley) a gray] leaves Innovare ISOLATION AND IDENTIFICATION OF POTENTIAL CYTOTOXIC COMPOUND FROM KEMBANG BULAN [TITHONIA DIVERSIFOLIA (HEMSLEY', 7 (6)(January).

Wan, H. *et al.* (2015) 'Promotion of flavonoid biosynthesis in leaves and calli of ornamental crabapple (*Malus* sp.) by high carbon to nitrogen ratios', *Frontiers in Plant Science*, 6(september), pp. 1–13. doi: 10.3389/fpls.2015.00673.

Wink, M. 2010. *Fungtion and Biotechnology of Plant Secondary Metabolites*. Oxford: Blackwell Publishing.

Xie, J. *et al.* (2022) 'BREVIPEDICELLUS and ERECTA control the expression of AtPRX17 to prevent Arabidopsis callus browning', *Journal of Experimental Botany*, 73(5), pp. 1516–1532. doi: 10.1093/jxb/erab512.

Yaseen, M. *et al.* (2013) 'Review: Role of carbon sources for in vitro plant growth and development', *Molecular Biology Reports*, 40(4), pp. 2837–2849. doi: 10.1007/s11033-012-2299-z.

Yosephine, F., Prasetyo, S. S. and Prima, K. a. (2011) 'Pengaruh Rasio Biji Teh/Pelarut Air Dan Temperatur Pada Ekstraksi Saponin Biji Teh Secara Batch', *Makalah Presentasi Jurusan Teknik Kimia. Universitas Katolik Parahyangan*, pp. 14–15.

Yunita, R. *et al.* (2021) 'Optimization of growth regulators to induce callus in chili [*Capsicum annum*] cv. Berangkai', *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 741(1). doi: 10.1088/1755-1315/741/1/012047.

Zachariah, T. J. and Leela, N. K. (2018) *Spices : Secondary Metabolites and Medicinal Properties*.

Zahara, M. *et al.* (2017) 'The Effects of Different Media , Sucrose Concentrations and Natural Additives on Plantlet Growth of *Phalaenopsis* Hybrid “ Pink ”', 60(December), pp. 1–15.

Zhao, G. *et al.* (2012) 'Three new sesquiterpenes from *Tithonia diversifolia* and their anti-hyperglycemic activity', *Fitoterapia*, 83(8), pp. 1590–1597. doi: 10.1016/j.fitote.2012.09.007.

Zhao, H. *et al.* (2015) 'Unveiling the mechanism of melatonin impacts on maize seedling growth: sugar metabolism as a case', *Journal of Pineal Research*, 59(2), pp.

255–266. doi: 10.1111/jpi.12258.

Zhong, L. *et al.* (2020) 'Exogenous melatonin promotes growth and sucrose metabolism of grape seedlings', *PLoS ONE*, 15(4), pp. 1–16. doi: 10.1371/journal.pone.0232033.



UIN SUNAN AMPEL
S U R A B A Y A