

**PENGARUH KOMBINASI ZAT PENGATUR TUMBUH AUKSIN (IAA
DAN 2,4-D) DAN SITOKININ (BAP) TERHADAP INDUKSI KALUS
DAN KANDUNGAN FLAVONOID TANAMAN ILER
(*Plectranthus scutellarioides*) SECARA *IN VITRO***

SKRIPSI



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

Disusun Oleh:

ZIYADATUL MAHMUDAH

NIM: H71217064

**PROGRAM STUDI BIOLOGI
JURUSAN SAINS
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI SUNAN AMPEL
SURABAYA
2021**

PERNYATAAN KEASLIAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini,

Nama : Ziyadatul Mahmudah

NIM : H71217064

Program Studi : Biologi

Angkatan : 2017

Menyatakan bahwa saya tidak melakukan plagiat dalam penulisan skripsi saya yang berjudul: “PENGARUH KOMBINASI ZAT PENGATUR TUMBUH AUKSIN (IAA DAN 2,4-D) DAN SITOKININ (BAP) TERHADAP INDUKSI KALUS DAN KANDUNGAN FLAVONOID TANAMAN ILER (*Plectranthus scutellarioides*) SECARA *IN VITRO*”. Apabila suatu saat nanti terbukti saya melakukan tindakan plagiat, maka saya bersedia menerima sanksi yang telah ditetapkan.

Demikian pernyataan keaslian ini saya buat dengan sebenar-benarnya.

Surabaya, 09 Agustus 2021
Yang menyatakan,



Ziyadatul Mahmudah
NIM. H71217064

HALAMAN PERSETUJUAN

Skripsi

Pengaruh Kombinasi Zat Pengatur Tumbuh Auksin (IAA dan 2,4-D) dan
Sitokinin (BAP) Terhadap Induksi Kalus dan Kandungan Flavonoid
Tanaman Iler (*Plectranthus scutellarioides*) Secara *In Vitro*

Diajukan oleh:

Ziyadatul Mahmudah

NIM: H71217064

Telah diperiksa dan disetujui
di Surabaya, 02 Agustus 2021

Dosen Pembimbing Utama



Saiku Rokhim, M.KKK.
NIP.198612212014031001

Dosen Pembimbing Pendamping



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

PENGESAHAN TIM PENGUJI SKRIPSI

Skripsi Ziyadatul Mahmudah ini telah dipertahankan
di depan tim penguji skripsi
di Surabaya, 09 Agustus 2021

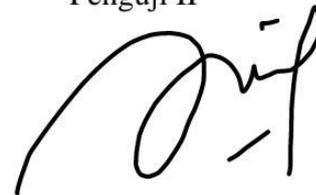
Mengesahkan,
Dewan Penguji

Penguji I



Saiku Rokhim, M.KKK.
NIP.198612212014031001

Penguji II



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

Penguji III



Atiqoh Zummah, M.Sc.
NIP.199111112019032026

Penguji IV



Funsu Andiana, M.Kes.
NIP.198710142014032002

Mengetahui,
Dekan Fakultas Sains dan Teknologi
UN Suran Ampel Surabaya




Dr. Evi Fatimatur Rusydiyah, M.Ag.
NIP.19732272005012003



KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI SUNAN AMPEL SURABAYA
PERPUSTAKAAN

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

LEMBAR PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

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

Nama : Ziyadatul Mahmudah
NIM : H71217064
Fakultas/Jurusan : SAINS DAN TEKNOLOGI/ BIOLOGI
E-mail address : ziyadatulmahmudah14@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 KOMBINASI ZAT PENGATUR TUMBUH AUKSIN (IAA
DAN 2,4-D) DAN SITOKININ (BAP) TERHADAP INDUKSI KALUS DAN
KANDUNGAN FLAVONOID TANAMAN ILER (*Plectranthus scutellarioides*)
SECARA IN VITRO

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

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

Demikian pernyataan ini yang saya buat dengan sebenarnya.

Surabaya, 09 Agustus 2021
Penulis

(Ziyadatul Mahmudah)

Tanaman iler memiliki daun berwarna ungu kecoklatan sampai ungu kehitaman. Daun tanaman ini termasuk daun tunggal yang memiliki helaian daun berbentuk bulat telur, ujung meruncing, tepi beringgit, tulang daun menyirip jelas, permukaan daunnya mengkilap, dan berambut halus. Tanaman iler memiliki batang bersegi empat dengan alur yang agak dalam pada masing-masing sisinya. Batang tanaman iler berambut dan memiliki percabangan yang banyak. Tinggi batang tanaman iler sekitar 0,5 – 15 m (gambar 2.1) (Qalbi *et al.*, 2017).

Tanaman iler merupakan tumbuhan yang berasal dari daerah Asia Tenggara. Tanaman iler dapat tumbuh secara liar di ladang atau di kebun dan dapat hidup pada ketinggian 1300 m di atas permukaan laut. Tanaman ini memiliki keistimewaan yaitu jenis dan warna daun yang beraneka ragam. Iler dapat ditemukan di sekitar sungai atau pematang sawah dan juga di pinggir-pinggir jalan sebagai tumbuhan liar. Namun saat ini tanaman iler dijadikan sebagai tanaman hias dengan berbagai variasi yang indah (gambar 2.1) (Heyne, 1987:1699).

Tanaman iler memiliki kandungan minyak atsiri, steroid, tanin, dan saponin. Kadar tanin merupakan kandungan tertinggi yang tersebar pada tanaman iler (Mutiatikum *et al.*, 2010). Selain itu, daun iler mengandung sterol dan triterpen dan juga memiliki kandungan diterpen (Ragasa *et al.*, 2001). Kandungan terpenoid (mono-, sesqui, did an tri), fenol misalnya asam fenol dan asam rosmarinat, serta kandungan flavonoid yaitu flavon juga terkandung dalam tanaman iler (David and Chariton, 2014).

Tanaman dari famili Lamiaceae ini memiliki kandungan flavonoid yang

menciptakan berbagai macam tanaman dan manfaat yang terkandung di dalamnya. Hal tersebut hanya diketahui oleh orang yang beriman dan berakal yang selalu bertafakkur terhadap kekuasaan Allah SWT.

2.2 Kultur Jaringan

Kultur jaringan merupakan pemisahan bagian atau jaringan tanaman dari tanaman asal untuk ditumbuhkan dalam keadaan yang steril pada suatu media yang nantinya sel-sel mampu tumbuh dan mengalami pembelahan. Kultur yang dihasilkan dapat berupa kultur organ yang telah terdiferensiasi dan sel-sel meristematik yang belum terdiferensiasi atau biasa disebut kultur kalus (Indrayanto, 1986).

Menurut Lawalata (2011), kultur jaringan dapat didefinisikan sebagai suatu metode yang digunakan untuk mengisolasi bagian tanaman dan ditumbuhkan dalam keadaan steril sehingga bagian tanaman mampu memperbanyak diri dan beregenerasi menjadi tanaman utuh kembali. Melalui teknik ini, bibit yang diproduksi lebih banyak, seragam, bebas hama dan penyakit. Dengan adanya teknik kultur jaringan ini memungkinkan manipulasi sel dan molekul untuk memperbaiki sifat tanaman serta mempertinggi produksi dan kualitasnya.

Eksplan merupakan bagian tanaman yang dijadikan sebagai bahan inokulum awal yang ditanam dalam media dan nantinya akan mengalami perkembangan dan pertumbuhan tertentu. Eksplan menjadi bahan dasar pembentukan kalus yaitu bentuk awal calon tunas yang kemudian mengalami proses perlengkapan tanaman seperti daun, batang, dan akar. Pada kultur jaringan, eksplan yang digunakan harus yang masih muda (primordia) karena

sel-selnya masih bersifat meristematis dan sudah mengalami proses diferensiasi (Yuliarti, 2010).

Kecepatan tumbuh kalus juga dipengaruhi oleh eksplan yang digunakan. Eksplan yang ditanam umumnya bagian daun muda karena bersifat meristematis dan diharapkan dapat menumbuhkan kalus lebih cepat. Hal ini selaras dengan pernyataan Wulandari *et al* (2004) bahwa penggunaan eksplan dari jaringan muda lebih berhasil karena memiliki sel-sel yang masih aktif membelah, dinding sel yang tipis karena belum terjadi penebalan lignin dan selulose yang menyebabkan kekakuan pada sel.

2.3 Induksi Kalus

Induksi kalus merupakan tahapan penting dalam hibridisasi somatik melalui fusi protoplas sehingga dihasilkan tanaman hibrida serta pembentukan embrio dalam embriogenesis somatik. Kalus yang bertekstur lemah dapat distimulasi dengan konsentrasi auksin yang lebih tinggi dibandingkan dengan konsentrasi sitokinin. Dalam induksi kalus terdapat faktor-faktor yang mempengaruhi pertumbuhannya, seperti komposisi media, kondisi lingkungan kultur, jenis dan genotipe eksplan, serta zat pengatur tumbuh (Waryastuti *et al.*, 2017).

Salah satu teknik kultur jaringan yang berperan dalam produksi metabolit sekunder yaitu melalui induksi kalus. Menginduksi terbentuknya kalus merupakan langkah penting yang mengusahakan rangsangan agar berdiferensiasi membentuk tunas dan akar. Jika suatu eksplan ditanam dalam media padat atau media cair yang sesuai, maka akan terbentuk kalus yang merupakan massa amorf yang tersusun atas sel-sel parenkim berdinding sel

tipis yang berkembang dari hasil poliferasi sel jaringan induk akibat adanya pelukaan pada jaringan dalam waktu 2-4 minggu tergantung pada tanamannya Jaringan tanaman yang dapat digunakan untuk membentuk kalus yaitu akar, batang, dan daun dengan cara mensterilkan eksplan dan menyayat bagian tanaman yang akan ditanam (Zuraidassanaaz, 2016).

Kalus biasanya dapat diinduksi dengan menambahkan zat pengatur tumbuh auksin seperti 2,4-D, NAA, 2,4,5 T, picloram yang dikombinasikan dengan sitokinin. Kalus akan terbentuk secara langsung atau melalui subkultur berulang baik pada perlakuan yang sama maupun pada perlakuan yang berbeda. Pada proses induksi kalus biasanya terjadi permasalahan yang mempengaruhi proses pertumbuhan kalus seperti pencoklatan. Pencoklatan merupakan suatu keadaan yang menyebabkan tidak terjadi pertumbuhan atau kalus mengalami kematian yang ditandai dengan munculnya warna coklat atau hitam pada eksplan. Hal ini disebabkan karena adanya pengaruh akumulasi senyawa fenolik yang teroksidasi akibat stress mekanik atau pelukaan pada eksplan (Angraeni, 2018).

2.4 Media Kultur Jaringan

Salah satu faktor keberhasilan suatu kultur jaringan yaitu adanya media tumbuh. Komposisi media tumbuh telah diformulasikan untuk mengoptimalkan pertumbuhan dan perkembangan tanaman yang dikulturkan. Pemilihan media ini disesuaikan dengan tujuan dari kultur jaringan yang dilakukan. Terdapat dua macam media kultur secara fisik yaitu dapat berbentuk cair atau padat (Yusnita, 2003). Salah satu media yang dapat digunakan dalam menginduksi kalus yaitu media Murashige and Skoog (MS).

Media MS merupakan media kultur paling cocok karena terdiri dari vitamin, karbohidrat, dan garam anorganik. Amonium nitrat dan kalium nitrat berfungsi sebagai sumber nitrogen, sedangkan penambahan sukrosa digunakan sebagai sumber karbohidrat (Trivedi *et al.*, 2015). Media tanam yang digunakan harus mengandung unsur seperti mikronutrien ($<0,5$ mM/L), makronutrien ($>0,5$ mM/L), asam amino, suplemen nitrogen, vitamin, sumber karbon, zat organik, pengatur tumbuh tanaman, dan pematid seperti agar (George *et al.*, 2008).

Media yang dikembangkan oleh Murashige and Skoog digunakan secara luas untuk kultivasi kalus pada agar demikian juga kultur suspensi sel dalam media cair. Media MS memiliki keistimewaan yaitu kandungan nitrat, kalium, dan amoniumnya yang tinggi. Berbagai komposisi dasar dari media ini biasanya dibuat modifikasi, misalnya hanya menggunakan setengah dari konsentrasi garam-garam makro yang digunakan atau menggunakan komponen garam-garam makro berdasarkan MS yang disesuaikan. Selain media MS, terdapat beberapa contoh media lainnya seperti komposisi Knudson C (1964), Heller (1953), Nitsch dan Nitsch (1972), Gamborg B5 (1976), Linsmaier dan Skoog-LS (1965), serta Woody Plant Medium-WPM (1980) (Zuraidassanaaz, 2016).

2.5 Zat Pengatur Tumbuh

Zat pengatur tumbuh atau yang biasa disebut dengan ZPT merupakan senyawa organik bukan nutrisi yang dapat mendorong, menghambat, atau secara kualitatif mampu mengubah pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Terdapat 5 tipe zat pengatur tumbuh yaitu auksin, sitokinin, giberelin, asam

absisat, dan etilen. Zat pengatur tumbuh yang umum digunakan dalam perbanyakan tanaman yaitu auksin dan sitokinin dikarenakan berperan dalam proses pembelahan sel (Baihaqi, 2017).

Zat pengatur tumbuh dalam tanaman dapat mengatur pertumbuhan dan perkembangan tanaman pada setiap tingkat pertumbuhan dan perkembangan. Di dalam tanaman terdapat fitohormon yang menghambat, zat pengatur tumbuh (pendorong) ini akan bekerja secara sinergis dengan fitohormon yang menghambat. Interaksi inilah yang dapat menyebabkan pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Zat pengatur tumbuh dapat dibedakan menjadi dua, yaitu ZPT endogen dan ZPT eksogen (Wattimena, 1991).

Dalam menggunakan zat pengatur tumbuh, diperlukan adanya pengetahuan tentang cara menghitung dosis pada saat menentukan zat pengatur tumbuh yang akan digunakan. Hal ini sangat penting dilakukankarena jika perhitungannya tidak sesuai maka akan berakibat fatal bagi pertumbuhan jaringan. Pemberian zat pengatur tumbuh yang terlalu tinggi menyebabkan pertumbuhan menjadi terhambat (Andaryani, 2010). Zat pengatur tumbuh yang sering digunakan dalam menginduksi pembentukan kalus adalah auksin. Penambahan sitokinin juga berperan penting dalam memicu pembelahan dan pemanjangan sel sehingga dapat mempercepat perkembangan dan pertumbuhan kalus (Indah dan Ermavitalini, 2013).

2.6 Auksin

Auksin merupakan senyawa yang memiliki kemampuan dalam mendukung terjadinya pemanjangan sel pada pucuk yang berstruktur kimia indole ring. Banyaknya kandungan auksin dalam tanaman sangat

mempengaruhi pertumbuhan tanaman. Struktur molekul dari auksin sangat menentukan pertumbuhan dan perkembangan tanaman, meliputi: 1) adanya struktur cincin yang tidak jenuh, 2) adanya rantai keasaman, 3) adanya gugus karboksil (COOH) dari struktur cincin, 4) adanya pengaturan ruangan antara struktur cincin dengan rantai keasaman (Suprpto, 2004).

Aktifitas auksin dalam kultur jaringan mampu memacu perakaran dari kalus yang tidak berdiferensiasi. Bersamaan dengan hormon sitokinin yang menginduksi pembentukan tunas, auksin memungkinkan regenerasi tanaman dari kalus yang dikultur. Auksin sangat mempengaruhi morfologi akar, menghambat pemanjangan akar, dan meningkatkan produksi akar lateral (Woodward and Bartel, 2005). Selain itu, auksin juga digunakan untuk mempertahankan kultur kalus (Zaerr and Mapes, 1982).

Peran auksin yaitu mempengaruhi pembesaran, pemanjangan, dan pembelahan sel, serta mempengaruhi metabolisme protein dan asam nukleat. Selain itu, auksin dapat mempengaruhi fisiologis tanaman yaitu dapat menghambat tunas lateral akibat peran auksin dalam dormansi apikal yang bergerak dari bagian apikal secara basipetal. Taraf auksin dalam sel tergantung pada bagian tanaman yang diambil seperti jenis tanaman dan umur tanaman (Lawalata, 2011). Jenis hormon auksin yang biasa digunakan dalam perbanyakan tanaman yaitu IAA dan 2,4-D.

2.6.1 ZPT IAA

Indole-3-acetic acid (IAA) merupakan komponen penting dari kelompok auksin sebagai hormon pertumbuhan endogen yang dapat merangsang proses pemanjangan sel. Jika diberikan bersamaan dengan

spektrofotometer UV-VIS. Spektrum serapan ultra violet dan serapan tampak merupakan cara tunggal yang paling bermanfaat untuk mengidentifikasi struktur flavonoid. Flavonoid memiliki kandungan sistem aromatis yang terkonjugasi dan dapat menunjukkan pita serapan kuat daerah UV-VIS (Rohyami, 2008). Standar yang digunakan yaitu flavonoid rutin (quersetin) (Slimestad *et al.*, 2005). Panjang gelombang yang digunakan dalam pengukuran spektrofotometer UV adalah panjang gelombang 200-400nm. Spektrum UV disebut juga spektrum elektronik karena terjadi akibat hasil interaksi radiasi UV terhadap molekul sehingga molekul mengalami transisi elektronik (Mulja, 1990).

Secara eksperimental, mengukur banyaknya radiasi yang diserap oleh suatu molekul sebagai fungsi frekuensi radiasi sangatlah mudah. Suatu grafik yang menghubungkan antara banyaknya sinar yang diserap dengan frekuensi (atau panjang gelombang) sinar yang merupakan spektrum absorpsi. Dengan demikian, spectra dapat digunakan untuk bahan informasi yang bermanfaat untuk analisis kualitatif. Banyaknya sinar yang diabsorpsi pada panjang gelombang tertentu sebanding dengan banyaknya molekul yang menyerap radiasi, sehingga spectra absorpsi juga dapat digunakan untuk analisis kuantitatif (Gandjar dan Rohman, 2007).

Gandjar dan Rohman (2007), beberapa hal yang perlu diperhatikan dalam analisis menggunakan spektrofotometri ultraviolet:

- a. Pemilihan panjang gelombang maksimum
- b. Pembuatan kurva kalibrasi
- c. Pembacaan absorbansi sampel atau cuplikan

plastik. Setelah semua terbungkus, alat-alat tersebut dimasukkan ke dalam autoklaf dan disterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit.

Selain alat-alat tersebut, ruang kerja juga harus disterilkan dengan cara membersihkan dinding 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 lampu neon dan *blower*.

3.5.2 Tahap Pembuatan Media

Pada penelitian ini digunakan media Murashige dan Skoog (MS) yang komposisinya dapat dilihat pada lampiran 1. Media yang diperlukan yaitu 60 ml setiap perlakuannya. Langkah awal yaitu menimbang media MS sebanyak 0,26 gram, kemudian gula sebanyak 1,8 gram. Bahan-bahan yang sudah ditimbang dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer, kemudian dilarutkan dengan akuades sampai volume larutan mencapai 60 ml. Kemudian ditambahkan zat pengatur tumbuh IAA, 2,4-D, dan BAP sesuai dengan yang telah ditentukan. Selanjutnya, diukur pH larutan media sekitar 5,6 – 5,8, jika pH < 5,6 maka ditambahkan NaOH dan jika pH > 5,8 maka ditambahkan HCl. Kemudian ditambahkan agar sebanyak 0,48 gram. Setelah itu, larutan media dipanaskan di atas *hot plate* hingga

gram diekstraksi menggunakan metode maserasi yaitu dengan cara merendam serbuk ke dalam 5 ml metanol selama 24 jam. Proses ini diulang sebanyak 2 kali agar senyawa dapat larut sempurna. Kemudian ekstrak disaring dan dipartisi menggunakan *n*-heksan dengan perbandingan 1:1. Setelah ditambahkan *n*-heksan akan terbentuk dua lapisan, lapisan atas diambil dan disimpan dalam tempat yang bersih. Lapisan bawah dipartisi dengan etil asetat dengan perbandingan 1:1 yang bertujuan untuk mengekstrak senyawa flavonoid. Kemudian ekstrak etil asetat diambil sebanyak 5 ml untuk dianalisis kadar flavonoid.

b. Pembuatan Larutan Standar Kuersetin

Pembuatan larutan induk dengan cara menimbang kuersetin sebanyak 10 mg dan dilarutkan dalam metanol p.a sebanyak 100 ml, sehingga dihasilkan larutan kuersetin 100 ppm. Selanjutnya dilakukan pengenceran seri pada konsentrasi 10, 20, 30, 40, dan 50 ppm dengan cara mengambil 1; 2; 3; 4; dan 5 ml pada larutan induk dan masing-masing dilarutkan dalam 10 ml metanol p.a.. Kemudian larutan tersebut dipekatkan dalam suhu ruang. Setelah itu, masing-masing konsentrasi ditambahkan 0,25 ml metanol, 1,25 ml akuades, dan 75 μ L larutan NaNO_2 5% dan ditunggu selama 6 menit. Kemudian ditambahkan 150 μ L AlCl_3 10% secara perlahan dan ditunggu 5 menit. Kemudian ditambahkan 0,5 mL NaOH 1 N dan akuades sampai mencapai volume 2,5 ml. Selanjutnya larutan dianalisis menggunakan spektrofotometer UV-VIS dengan panjang gelombang 514 nm.

kombinasi 4 ppm IAA dan 0,5 ppm BAP mampu membentuk kalus paling cepat yaitu 8,3 HST dibandingkan dengan perlakuan yang lain. Selain itu, pada perlakuan B memiliki rata-rata tertinggi pada hasil pengukuran berat segar dan berat kering kalus tanaman iler yaitu sebesar 0,3301 gram dan 0,0535 gram. Sementara itu, perlakuan J menggunakan kombinasi 4 ppm 2,4-D dan 0,5 ppm BAP menghasilkan rata-rata berat segar dan berat kering kalus terendah yaitu sebesar 0,1120 gram dan 0,0172 gram. Hasil penelitian yang telah dilakukan diuraikan sebagai berikut:

4.1.1 Waktu Pembentukan Kalus

Waktu pembentukan kalus diperoleh dari pengamatan yang dilakukan setiap hari setelah penanaman eksplan yang dinyatakan dengan HST (Hari Setelah Tanam). Pembentukan kalus pada penelitian ini ditandai dengan melengkungnya eksplan dan pembengkakan eksplan, kemudian munculnya gumpalan berwarna putih pada bagian permukaan eksplan (bekas irisan) yang kemudian menyebar pada permukaan eksplan (gambar 4.1). Hal ini sesuai dengan pernyataan Puteri *et al* (2014), bahwa proses induksi kalus diawali dengan melengkungnya eksplan daun yang dilanjutkan dengan munculnya tonjolan-tonjolan berwarna putih pada bagian bekas luka irisan yang akan terus berkembang menjadi kalus. Data hasil rata-rata waktu pembentukan kalus dapat dilihat pada tabel 4.2

yaitu 10,3 HST, perlakuan 4 ppm IAA + 0,5 ppm BAP (B) yaitu 8,3 HST, perlakuan 0,1 ppm IAA + 0,1 ppm BAP (C) yaitu 11,3 HST, perlakuan 4 ppm IAA + 0,1 ppm IAA (D) yaitu 14,3 HST, perlakuan 0,5 ppm 2,4-D + 0,5 ppm BAP (I) yaitu 13,3 HST, perlakuan 4 ppm 2,4-D + 0,5 ppm BAP (J) yaitu 15,6 HST, perlakuan 0,1 ppm 2,4-D + 0,1 ppm BAP (K) yaitu 14,6 HST, dan perlakuan 4 ppm 2,4-D + 0,1 ppm BAP (L) yaitu 13,6 HST. Sementara itu, pada perlakuan kontrol (M) tanpa pemberian zat pengatur tumbuh tidak terlihat adanya pertumbuhan kalus tanaman iler.

Data yang diperoleh kemudian diuji secara statistik dan diketahui bahwa data waktu pembentukan kalus tidak berdistribusi normal dilihat dari hasil uji normalitas yang memiliki nilai ($0,000 < 0,05$), sehingga dilanjutkan dengan uji *Kruskal Wallis* karena *p value* kurang dari taraf signifikansi ($\alpha=0,05$). Hasil uji *Kruskal Wallis* memiliki nilai *Asymp. Sig.* sebesar 0,002 yang berarti terdapat perbedaan waktu pembentukan kalus tanaman iler karena *p value* $< 0,05$ (Lampiran 2), sehingga dapat dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney*.

Hasil uji *Mann-Whitney* menunjukkan bahwa terdapat perbedaan waktu pembentukan kalus pada beberapa perlakuan yang ditandai dengan nilai *Asymp.Sig* $< 0,05$ yang dapat dilihat pada tabel 4.3.

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

| Perlakuan | A | B | C | D | I | J | K | L |
|-----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| A | | 0,043* | 0,346 | 0,043* | 0,043* | 0,043* | 0,043* | 0,043* |
| B | | | 0,046* | 0,043* | 0,043* | 0,043* | 0,043* | 0,043* |
| C | | | | 0,046* | 0,105 | 0,046* | 0,046* | 0,072 |
| D | | | | | 0,099 | 0,068 | 0,456 | 0,197 |
| I | | | | | | 0,043* | 0,068 | 0,456 |
| J | | | | | | | 0,099 | 0,043* |
| K | | | | | | | | 0,099 |
| L | | | | | | | | |
| M | 0,034* | 0,034* | 0,037* | 0,034* | 0,034* | 0,034* | 0,034* | 0,034* |

Keterangan: A= 0,5 ppm IAA + 0,5 ppm BAP, B= 4 ppm IAA + 0,5 ppm BAP, C= 0,1 ppm IAA + 0,1 ppm BAP, D= 4 ppm IAA + 0,1 ppm BAP, I= 0,5 ppm 2,4-D + 0,5 ppm BAP, J= 4 ppm 2,4-D + 0,5 ppm BAP, K= 0,1 ppm 2,4-D + 0,1 ppm BAP, L= 4 ppm 2,4-D + 0,1 ppm BAP, M(kontrol)= 0 ppm IAA, 2,4-D + 0 ppm BAP. *= perbedaan signifikan pada uji *Mann-Whitney* (p value < 0,05).

Berdasarkan tabel 4.3 diketahui bahwa perlakuan M berbeda signifikan dengan perlakuan A, B, D I, J, K, L ($p = 0,034$), dan C ($p = 0,037$), perlakuan A berbeda signifikan dengan perlakuan B, D, I, J, K, dan L ($p = 0,043$), perlakuan B berbeda signifikan dengan perlakuan C ($p = 0,046$), D, I, J, K, dan L ($p = 0,043$), perlakuan C berbeda signifikan dengan perlakuan D, J, dan K ($p = 0,046$), perlakuan I berbeda signifikan dengan perlakuan J ($p = 0,043$), dan perlakuan J berbeda signifikan dengan perlakuan L ($p = 0,043$). Perbedaan yang signifikan pada waktu pembentukan kalus dipengaruhi oleh kecepatan tumbuh kalus setelah penanaman eksplan. Perbedaan tersebut dikarenakan jenis dan konsentrasi zat pengatur tumbuh yang diberikan berbeda-beda. Leopold (1963) dalam Nurlaeni dan Surya (2015), menjelaskan bahwa pengaruh pemberian suatu konsentrasi zat pengatur tumbuh pada setiap jenis tanaman berbeda-beda. Efektifitas zat pengatur tumbuh pada tanaman dipengaruhi oleh konsentrasi zat pengatur tumbuh yang diberikan, karena konsentrasi yang berbeda akan menimbulkan aktivitas yang berbeda pula. Silalahi (2015) menambahkan bahwa jenis zat pengatur tumbuh

pada perlakuan 4 ppm 2,4-D + 0,5 ppm BAP yaitu 15,6 HST. Kecepatan pembentukan kalus dipengaruhi oleh daya kerja zat pengatur tumbuh yang diberikan dan fitohormon yang terdapat pada eksplan. Penambahan zat pengatur tumbuh eksogen akan mengubah gradien fitohormon dalam sel-sel eksplan. Efektivitas dari zat pengatur tumbuh eksogen (auksin) bergantung pada konsentrasi hormon endogen dalam jaringan tanaman (Indah dan Ermavitalini, 2013).

Kecepatan pertumbuhan kalus berbeda-beda juga dipengaruhi oleh kemampuan jaringan menyerap zat hara yang tersedia. Kemampuan jaringan menyerap zat hara disebabkan oleh kombinasi konsentrasi zat pengatur tumbuh yang diberikan dalam media. Kombinasi konsentrasi tersebut menyebabkan konsentrasi antara auksin eksogen dan sitokinin endogen yang terkandung dalam eksplan menjadi seimbang. Pemberian konsentrasi yang seimbang antara auksin dan sitokinin dalam kultur *in vitro* dapat memacu pembentukan kalus melalui interaksi dalam pembesaran dan pembelahan sel (Massa, 2016).

Pertumbuhan kalus paling lama pada penelitian ini yaitu penambahan 4 ppm 2,4-D yang dikombinasikan dengan 0,5 ppm BAP. Menurut Massa (2016), waktu induksi kalus yang relatif lama dikarenakan ketidakseimbangan konsentrasi 2,4-D dan BAP, sehingga sejak awal pertumbuhan kalus berlangsung lambat. Penelitian ini berbanding terbalik dengan penelitian yang dilakukan oleh Lizawati *et al.* (2012) bahwa penambahan 4 ppm 2,4-D yang dikombinasikan dengan 0,5 ppm BAP mampu memacu terbentuknya kalus pada eksplan daun

muda durian varietas Selat yang muncul 8 hari setelah tanam. Perbedaan lama waktu eksplan dalam membentuk kalus dipengaruhi oleh komposisi zat pengatur tumbuh dalam media serta kondisi fisiologis dari eksplan yang digunakan (Massa, 2016). Selain itu, penggunaan zat pengatur tumbuh yang berbeda juga berpengaruh terhadap waktu pembentukan kalus. Menurut Lizawati *et al.* (2012), pembentukan kalus sangat dipengaruhi oleh jenis dan keseimbangan antara auksin dan sitokinin yang diberikan dalam media kultur.

Penggunaan zat pengatur tumbuh auksin (IAA) pada penelitian ini lebih efektif dibandingkan dengan zat pengatur tumbuh auksin (2,4-D). Hal ini dikarenakan zat pengatur tumbuh IAA memiliki sifat kimia yang lebih stabil dan mobilitas dalam tanaman rendah, sehingga penggunaannya lebih berhasil (Hendaryono dan Wijayani, 1994). Selain itu, IAA juga dikenal sebagai zat pengatur tumbuh yang dapat mempercepat pertumbuhan kalus (Zulraufianti dan Paserang, 2019).

4.1.2 Morfologi Kalus

Pada beberapa perlakuan kombinasi zat pengatur tumbuh IAA dan BAP serta 2,4-D dan BAP menunjukkan adanya respon yang bervariasi terhadap kalus tanaman iler (*Pletranthus scutellarioides*). Respon yang bervariasi dapat dilihat dari warna kalus yang telah diinkubasi selama 4 minggu (gambar 4.3; tabel 4.4)

menghasilkan warna kalus cenderung putih kecoklatan. Menurut Wardani *et. al.*, (2004), kalus yang memiliki warna putih menunjukkan bahwa pertumbuhan kalus tersebut baik, dan warna hijau pada kalus menunjukkan bahwa kalus tersebut mengandung klorofil.

Beberapa warna kalus yang dihasilkan dari kombinasi zat pengatur tumbuh 2,4-D dan BAP mengalami *browning* atau pencoklatan. Browning merupakan perubahan warna eksplan menjadi kecoklatan dan kemudian eksplan tidak dapat berkembang untuk tumbuh kalus. Browning dapat disebabkan karena adanya senyawa fenol dalam jaringan tanaman yang dioksidasi oleh enzim polyfenoloksidase ketika eksplan mengalami pelukaan (Dwiyani, 2015). Pelukaan saat pemotongan eksplan menyebabkan jaringan yang terluka mengalami stres sehingga terjadi pencoklatan (Hendaryono *et al.*, 1994). Beberapa kalus pada perlakuan 2,4-D dan BAP tidak mengalami *browning*. Hal ini dikarenakan konsentrasi zat pengatur tumbuh yang diberikan sudah seimbang sehingga kalus dapat tumbuh dengan baik dan masih aktif melakukan metabolisme dalam sel. Menurut Hanifah (2007), penambahan sitokinin yang semakin meningkat cenderung menunjukkan warna kalus hijau, putih (cerah) lebih tahan lama.

Pemberian zat pengatur tumbuh IAA dan BAP pada penelitian ini menghasilkan warna kalus cenderung putih kehijauan. Penelitian yang dilakukan oleh Nisa (2017) yang menggunakan zat pengatur tumbuh IAA dan BAP menghasilkan warna kalus cenderung putih pada tanaman sambung nyawa. Selain itu, penelitian yang dilakukan oleh

Zuraidassanaaz (2016) menunjukkan bahwa penambahan IAA dan BAP mampu menghasilkan kalus sirih hitam dengan berbagai macam warna seperti putih, putih kehijauan, putih kekuningan dan putih kecoklatan. Sementara itu, pemberian zat pengatur tumbuh 2,4-D dan BAP menghasilkan warna kalus cenderung putih kecoklatan. Penelitian ini selaras dengan penelitian yang dilakukan oleh Indah dan Ermavitalini (2013), bahwa penambahan ZPT 2,4-D dan BAP menghasilkan kalus daun nyamplung berwarna kecoklatan pada hampir semua perlakuan.

Penggunaan zat pengatur tumbuh IAA menghasilkan kalus lebih bagus dibandingkan dengan penggunaan 2,4-D, sehingga tidak terdapat eksplan yang mengalami browning. Pada penggunaan 2,4-D terdapat eksplan yang mengalami browning, hal tersebut dikarenakan respon 2,4-D dan BAP dengan konsentrasi yang tidak sesuai akan menyebabkan kemunduran fisiologis eksplan. Andaryani (2010) menyatakan bahwa penggunaan zat pengatur tumbuh pada konsentrasi yang tidak sesuai maka akan berakibat fatal bagi pertumbuhan jaringan. Pemberian zat pengatur tumbuh yang terlalu tinggi menyebabkan pertumbuhan menjadi terhambat.

Selain dilihat dari warna kalus, pertumbuhan kalus juga dapat dilihat dari tekstur kalus. Pada penelitian ini, kalus yang dihasilkan pada kombinasi konsentrasi IAA dan BAP serta 2,4-D dan BAP memiliki tekstur yang sama yaitu bertekstur kompak (tabel 4.1). Kalus yang bertekstur kompak dilihat dari ciri-ciri kalus yang dihasilkan yaitu padat dan keras. Kalus kompak adalah kalus yang tersusun atas sel-sel

berbentuk nodular dengan struktur padat dan mengandung air yang cukup banyak (Manuhara, 2001). Kalus yang bertekstur kompak adalah efek dari kombinasi auksin dan sitokinin yang mempengaruhi potensial air dalam sel. Hal tersebut menyebabkan penyerapan air dari medium ke dalam sel meningkat sehingga sel menjadi lebih kaku (George, 1993).

Kalus akan menjadi kompak karena sistem transport sitokinin membawa air dan zat hara dari bagian basal ke apeks melalui pembuluh pengangkut dan mempengaruhi potensial osmotik dalam sel. Penambahan sukrosa dalam medium akan mengalir melalui pembuluh floem yang dapat menimbulkan tekanan turgor. Tekanan tersebut disebabkan oleh adanya perbedaan konsentrasi larutan, sehingga air dan zat hara akan masuk ke dalam sel melalui cara osmosis. Hal tersebut membuat dinding-dinding sel semakin kaku, sehingga kalus tersebut menjadi kompak (Purwaningsih *et al.*, 2007).

Tekstur kalus yang dihasilkan dalam penelitian ini sama yaitu bertekstur kompak, dikarenakan jenis eksplan, umur kalus, komposisi media, dan kondisi pertumbuhannya sama. Mahadi *et al.* (2014) mengatakan bahwa tekstur kalus dapat dipengaruhi oleh beberapa hal seperti jenis eksplan, umur kalus, komposisi media, zat pengatur tumbuh yang digunakan, kondisi pertumbuhan seperti cahaya dan suhu, serta waktu pertumbuhan kalus.

Pada penelitian ini, pemberian kombinasi konsentrasi baik IAA dan BAP serta 2,4-D dan BAP menghasilkan kalus yang bertekstur kompak. Hal ini sebanding dengan penelitian Nisa' (2017) yang menghasilkan

Tabel 4.6 Hasil Uji *Mann-Whitney* Berat Segar Kalus

| Perlakuan | A | B | C | D | I | J | K | L |
|-----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| A | | 0,127 | 0,275 | 0,050 | 0,050 | 0,050 | 0,050 | 0,050 |
| B | | | 0,050 | 0,050 | 0,050 | 0,050 | 0,050 | 0,050 |
| C | | | | 0,050 | 0,127 | 0,050 | 0,050 | 0,127 |
| D | | | | | 0,513 | 0,050 | 0,513 | 0,275 |
| I | | | | | | 0,050 | 0,275 | 0,827 |
| J | | | | | | | 0,275 | 0,050 |
| K | | | | | | | | 0,275 |
| L | | | | | | | | |
| M | 0,037* | 0,037* | 0,037* | 0,037* | 0,037* | 0,037* | 0,037* | 0,037* |

Keterangan: A= 0,5 ppm IAA + 0,5 ppm BAP, B= 4 ppm IAA + 0,5 ppm BAP, C= 0,1 ppm IAA + 0,1 ppm BAP, D= 4 ppm IAA + 0,1 ppm BAP, I= 0,5 ppm 2,4-D + 0,5 ppm BAP, J= 4 ppm 2,4-D + 0,5 ppm BAP, K= 0,1 ppm 2,4-D + 0,1 ppm BAP, L= 4 ppm 2,4-D + 0,1 ppm BAP, M(kontrol)= 0 ppm IAA, 2,4-D + 0 ppm BAP. *= perbedaan signifikan pada uji *Mann-Whitney* (*p value* < 0,05).

Berdasarkan tabel 4.6 dapat diketahui bahwa berat segar kalus memiliki perbedaan yang signifikan. Perlakuan tanpa pemberian zat pengatur tumbuh (M) memiliki perbedaan dengan perlakuan A, B, C, D, I, J, K, dan L dengan nilai $p = 0,037 < 0,05$. Perbedaan ini disebabkan oleh zat pengatur tumbuh yang ditambahkan dalam media. Perlakuan tanpa pemberian zat pengatur tumbuh tidak mampu menginduksi kalus dikarenakan hormon endogen yang terdapat dalam eksplan tidak mampu menginduksi kalus.

Berat segar kalus meningkat dipengaruhi oleh pembesaran sel. Zat pengatur tumbuh auksin menyebabkan pengenduran dinding sel yang mengakibatkan air dapat masuk secara osmosis (Asmono dan Sari, 2016). Auksin dapat mengubah aktivitas enzim yang berperan dalam sintesis komponen-komponen dinding sel dan menyusun kembali dalam satu matriks dinding sel yang utuh sehingga akan berpengaruh terhadap berat sel (Abidin, 1990). Auksin juga mendorong terjadinya elongasi sel yang diikuti dengan pembesaran sel dan meningkatnya berat segar. Peningkatan berat segar ini terutama disebabkan karena meningkatnya

Keterangan: A= 0,5 ppm IAA + 0,5 ppm BAP, B= 4 ppm IAA + 0,5 ppm BAP, C= 0,1 ppm IAA + 0,1 ppm BAP, D= 4 ppm IAA + 0,1 ppm BAP, I= 0,5 ppm 2,4-D + 0,5 ppm BAP, J= 4 ppm 2,4-D + 0,5 ppm BAP, K= 0,1 ppm 2,4-D + 0,1 ppm BAP, L= 4 ppm 2,4-D + 0,1 ppm BAP, M(kontrol)= 0 ppm IAA, 2,4-D + 0 ppm BAP

Berdasarkan gambar 4.4, dapat dilihat bahwa rata-rata berat segar kalus tertinggi pada perlakuan B yaitu kombinasi antara 4 ppm IAA dan 0,5 ppm BAP yaitu sebesar 0,3301 gram. Sedangkan rata-rata berat segar terendah pada perlakuan J yaitu kombinasi antara 4 ppm 2,4-D dan 0,5 ppm BAP yaitu sebesar 0,1120 gram. Berat segar kalus yang tinggi dapat disebabkan karena memiliki kandungan air yang tinggi. Berat segar yang dihasilkan tergantung pada kecepatan sel-sel tersebut membelah diri, memperbanyak diri, dan dilanjutkan dengan membesarnya kalus (Rahayu *et al.*, 2003).

Perbedaan berat segar yang dihasilkan disebabkan karena jenis dan konsentrasi zat pengatur tumbuh yang diberikan juga berbeda-beda. Hal tersebut memengaruhi berat kalus yang dihasilkan karena setiap sel memiliki respon masing-masing terhadap zat pengatur tumbuh yang diberikan. Hal ini selaras dengan pernyataan Lakitan (1996), bahwa setiap sel mempunyai kepekaan tersendiri terhadap zat pengatur tumbuh yang diberikan. Selain itu, waktu setiap sel mengalami pembelahan sel untuk memperbanyak diri juga tidak sama karena siklus selnya akan selalu berbeda. Nurlaeni dan Surya (2015) menambahkan bahwa pengaruh pemberian suatu konsentrasi zat pengatur tumbuh berbeda-beda pada setiap jenis tanaman, bahkan berbeda juga antar varietas dalam suatu spesies. Efektivitas zat pengatur tumbuh pada tanaman dipengaruhi oleh konsentrasi yang diberikan, karena konsentrasi yang berbeda akan

menimbulkan aktivitas yang berbeda pula.

Pemberian zat pengatur tumbuh auksin dan sitokinin pada perbandingan yang tepat dapat menginisiasi pembelahan sel dan meningkatkan pertumbuhan sel. Auksin berpengaruh terhadap pertumbuhan jaringan diduga menginduksi sekresi ion H^+ keluar melalui dinding sel. Pengasaman dinding sel ini menyebabkan K^+ diambil yang dapat mengurangi potensial air dalam sel dan mengakibatkan air mudah masuk ke dalam sel dan kemudian sel akan membesar (Maftuchah dan Joko, 1998). Sitokinin yang ditambahkan berperan dalam pembelahan sel dan sintesis protein. Pemacu pembelahan sel dan sintesis protein oleh sitokinin (BAP) menyebabkan sel berproliferasi yang mengakibatkan bertambahnya berat kalus yang dihasilkan (Wattimena, 1991).

Penelitian yang telah dilakukan oleh Ibrahim *et al.* (2018) mengenai induksi kalus tanaman iler menghasilkan berat segar kalus maksimum pada eksplan kotiledon yaitu sebesar 3,5 gram dengan penambahan zat pengatur tumbuh 2 ppm NAA + 2,5 ppm BA. Zaer dan Mapes (1982) menyatakan bahwa penambahan zat pengatur tumbuh auksin dan sitokinin dapat merangsang pembentukan kalus, tetapi optimalnya harus dengan variasi konsentrasi yang sesuai. Interaksi auksin dan sitokinin akan meningkatkan jumlah dan ukuran sel dalam jaringan. Sitokinin bila berinteraksi dengan auksin dapat merangsang mitosis dalam jaringan meristematik.

pembelahan sel (Wareing dan Phillips, 1981). Pemberian auksin dan sitokinin pada konsentrasi seimbang akan menghasilkan pertumbuhan yang optimal terhadap pembentukan kalus (George, 1993). Sedangkan jika konsentrasi sitokinin lebih tinggi dari auksin maka akan terbentuk tunas, dan jika konsentrasi auksin lebih tinggi dari sitokinin, maka akan membentuk kalus dan akar (Intias, 2012).

Penambahan zat pengatur tumbuh dalam media diduga dapat mempengaruhi metabolisme RNA yang berperan dalam sintesis protein melalui proses transkripsi molekul RNA. Peningkatan sintesis protein sebagai sumber tenaga dapat digunakan dalam pertumbuhan, sehingga berat kering kalus dapat mengalami peningkatan (Gunawan, 1992). Berat kering dan berat segar kalus pada penelitian ini memiliki korelasi, dimana nilai rerata berat segar kalus yang tinggi menghasilkan nilai rerata berat kering kalus tertinggi pula. Hal ini selaras dengan pernyataan Hardiyanto *et al.* (2004), bahwa antara berat segar dan berat kering kalus merupakan 2 faktor yang berkorelasi positif. Hal ini berarti semakin tinggi berat basah kalus, maka berat kering kalus juga mengalami kenaikan.

4.2 Pengaruh Kombinasi Zat Pengatur Tumbuh Auksin (IAA dan 2,4-D) dan sitokinin (BAP) Terhadap Kandungan Flavonoid pada Kalus Tanaman Iler (*Plectranthus scutellarioides*)

Salah satu jenis metabolit sekunder yang ditemukan pada tanaman iler yaitu flavonoid. Flavonoid termasuk dalam senyawa fenolik alam yang

berpotensi sebagai antioksidan dan mempunyai bioaktivitas sebagai obat. Flavonoid adalah turunan dari benzo- γ -pyrone yang terdiri dari cincin fenolik dan pyrane (Heim *et al.*, 2002). Salah satu jenis flavonoid yang banyak ditemukan dalam tumbuhan yaitu jenis flavonol. Flavonol sendiri terdiri atas kuersetin, kaemferol, dan mirisetin. Komponen terbanyak dalam suatu tanaman yaitu kuersetin (Koirewoa *et al.*, 2012). Kuersetin dapat ditemukan pada berbagai jenis tanaman seperti tanaman iler. Berdasarkan hasil penelitian Lumbessy *et al.* (2013), diketahui bahwa daun iler memiliki kadar kuersetin sebesar 14,246 mg/gram.

Kandungan flavonoid pada penelitian ini didapatkan dengan mengekstrak kalus tanaman iler yang telah didapatkan menggunakan metode maserasi. Maserasi merupakan suatu proses merendam sampel dengan pelarut yang digunakan pada temperatur dan kelembaban ruang (Peryoga *et al.*, 2015). Pelarut yang digunakan dalam proses maserasi yaitu pelarut metanol. Maserasi dengan metanol karena metanol merupakan pelarut yang dapat melarutkan hampir semua senyawa organik dalam tumbuhan baik dari yang polar hingga non polar (Rahmawati dan Hidajati, 2017). Setelah menggunakan metanol, ekstrak dipartisi menggunakan *n*-heksan yang bertujuan untuk menarik senyawa-senyawa yang bersifat non polar (Rahmawati dan Hidajati, 2017). Setelah dipartisi menggunakan *n*-heksan, ekstrak dipartisi menggunakan etil asetat. Hal ini dikarenakan etil asetat merupakan penyari yang dapat menyari senyawa flavonoid dalam konsentrasi yang besar (Stankovic, 2011).

Pengukuran kandungan flavonoid kalus tanaman iler pada penelitian ini

menghasilkan produksi metabolit sekunder yang tinggi.

Rahayu et al. (2003) menambahkan bahwa auksin berfungsi untuk meningkatkan kerja enzim fenilalanin amonia liase (PAL) yang menghasilkan sinamat dan fenilalanin dalam sintesis flavonoid. Jalur selanjutnya yaitu pembentukan flavonoid dari molanil Co-A, apabila auksin yang diberikan berkurang, maka pembentukan flavonoid juga akan berkurang. Sementara itu sitokinin mampu mengaktifkan proses-proses metabolisme dan sintesis protein. Menurut Wardani et al. (2004), interaksi antara ZPT auksin dan sitokinin dapat mempengaruhi produksi metabolit sekunder, dikarenakan zat pengatur tumbuh ini dapat menyebabkan perubahan fisiologi dan biokimia tanaman melalui pengaturan kerja enzim. Zat pengatur tumbuh berperan dalam pengikatan membran protein yang berpotensi untuk aktivitas enzim. Hasil pengikatan ini yang akan mengaktifkan enzim dan mengubah substrat menjadi beberapa produk baru. Produk baru ini mengakibatkan terjadinya reaksi-reaksi sekunder salah satunya yaitu pembentukan metabolit sekunder.

Pemberian konsentrasi IAA yang tinggi dan BAP yang lebih rendah menghasilkan kadar flavonoid total yang lebih tinggi dibandingkan dengan konsentrasi IAA lainnya. Sementara itu, pemberian 2,4-D dan BAP yang tinggi juga menghasilkan kadar flavonoid total yang tinggi pula dibandingkan dengan pemberian konsentrasi 2,4-D dan IAA yang lainnya, sehingga pemberian konsentrasi 2,4-D yang tinggi lebih optimal dalam menghasilkan kadar flavonoid total kalus tanaman iler pada penelitian ini. Kadar flavonoid total tertinggi pada penelitian ini yaitu pada perlakuan yang diberikan konsentrasi auksin lebih tinggi yaitu sebesar 33,7 mg/gram dan kadar flavonoid total

terendah pada pemberian konsentrasi auksin yang rendah yaitu sebesar 13,8 mg/gram. Penelitian ini sebanding dengan penelitian yang dilakukan oleh Wijaya (2012), bahwa kadar flavonoid total tertinggi pada kalus eksplan daun krisan dengan penambahan 4 ppm 2,4-D yaitu sebesar 70,9 mg/gram. Penggunaan ZPT 2,4-D dan BAP dalam induksi kalus dan analisis kandungan flavonoid juga dilakukan oleh Sugiyarto dan Kuswandi (2014) yang menghasilkan kadar flavonoid total dari sampel kalus eksplan daun binahong bertekstur kompak yaitu sebesar 0,019 mg/gram. Penambahan 2,4-D dalam media akan merangsang pembelahan dan pembesaran sel pada eksplan sehingga dapat memacu pembentukan dan pertumbuhan kalus, serta dapat meningkatkan senyawa flavonoid (Rahayu *et al.*, 2003).

Selain dipengaruhi oleh zat pengatur tumbuh, kadar flavonoid total juga dipengaruhi oleh tekstur kalus yang dihasilkan. Dalam penelitian ini menghasilkan kalus yang bertekstur kompak pada semua perlakuan. Kalus yang bertekstur kompak menghasilkan metabolit sekunder yang tinggi. Hal ini selaras dengan pernyataan Manuhara (2001) bahwa kalus yang memiliki tekstur kompak dan intermediet akan menghasilkan kandungan metabolit sekunder yang tinggi dibandingkan dengan kalus yang memiliki tekstur remah. Kalus yang bertekstur kompak masih dalam fase stasioner sehingga kalus mengalami penghambatan pertumbuhan. Sedangkan kalus yang bertekstur remah memiliki masa pembelahan sel lebih cepat sehingga produksi metabolit sekundernya menurun.

Pada penelitian ini, zat pengatur tumbuh auksin dan sitokinin yang digunakan memiliki konsentrasi yang berbeda-beda dan menghasilkan

- pada Ekstrak Metanol Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao* L.). *Kartika Jurnal Ilmiah Farmasi* 2(2): 33-37.
- Backer, C. A., and Brink, R. C. B. 1962. *Flora of Java (Spermatophytes only)*. Wolters Noordhoff NVP, The Netherlands.
- Baday, S. J. S. 2018. Plant Tissue Culture. *International Journal of Agriculture and Enviromental Research* 4(4): 977-990.
- Baldi, A., and Dixit, V. K. 2008. Enhanced Artemisinin Production by Cell Cultures of *Artemisia annua*. *Current Trends in Biology and Pharmacy* 2(2): 341-348.
- Baihaqi, H. 2017. Pengaruh Teknik Penyemaian dan Konsentrasi Benzyl-Adenin (BA) pada Pertumbuhan Bibit Manggis (*Garcinia mangostana* L.) Asal Biji. *Skripsi*. Universitas Lampung, Bandar Lampung.
- Basri, A. H. H. 2016. Kajian Pemanfaatan Kultur Jaringan dalam Perbanyakan Tanaman Bebas Virus. *Agrica Ekstensia* 10(1): 64-73.
- Bekti, R., Solichatun, dan E. Anggarwulan. 2003. Pengaruh Asam 2,4-Diklorofenoksiasetat (2,4-D) terhadap Pembentukan dan Pertumbuhan Kalus serta Kandungan Flavonoid Kultur Kalus *Acalypha indica* L. *Biofarmasi* 1(1): 1-6.
- Bustami, M. U. 2011. Penggunaan 2,4-D Untuk Induksi Kalus Kacang Tanah. *Media Litbang Sulteng* IV(2): 137-141.
- Catala, C., J. K. C. Rose, and A. B. Bennet. 2000. Auxin-Regulated Genes Encoding Cell Wall-Modifying Proteins are Expressed during Early Toato Fruit Growth. *Plant Physiology* 122(2): 527-534.
- Cook, N. C., and Samman, S. 1996. Review Flavonoids-Chemistry, Metabolism, Cardioprotectiv Effect, and Dietary Sources. *Journal of Nutritional Biochemistry* 7: 66-76.
- David, E. B., and Chariton, J. L. 2014. A Non Enzymatic Synthesis of Rosmarinic Acid and A Study of A Biomimetic Route to Rabdosiin. *Canada Journal Chemistry* 75: 1783-1794.
- Di, D. W., C. Zhang, P. Luo, C. W. An, and G. Q. Guo. 2016. The Biosynthesis of Auxin. *Plant Growth Regultion* 78: 275-285.
- Doloksaribu, R. 2009. Isolasi Senyawa Flavonoid dari Daun Tumbuhan Harimonting (*Rhodomyrtus tementosa* W.Ait.). *Skripsi*. Universitas Sumatera Utara, Medan.
- Dwiyani, R. 2015. *Kultur Jaringan Tanaman*. Pelawasari, Denpasar Barat.
- Evans D.A., Sharp W.R. and Flick C.E. 1981. *Growth and Behavior of Cell Cultures: Embryogenesis and Organogenesis*. Academic Press, New York.

- Fatmawati, A. 2008. Kajian Konsentrasi BAP dan 2,4-D Terhadap Induksi Kalus Tanaman *Artemisia annua* L. Secara In Vitro. *Skripsi*. Universitas Negeri Surakarta, Surakarta.
- Fatmawati, T. A., T. Nurhidayati, dan N. Jadid. 2010. Pengaruh Kombinasi Zat Pengatur Tumbuh IAA dan BAP pada Kultur Jaringan Tembakau *Nicotina tabacum* L. VAR. Prancak 95. *Jurnal Fakultas Matematika Ilmu Pengetahuan Alam*.
- Fauzy, E., Mansyur, dan A. Husni. 2016. Pengaruh Penggunaan Media Murashige 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). *Students e-Journal* 5(4): 1-22.
- Gandjar, I. G., dan Rohman, A. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Pustaka Pelajar, Yogyakarta.
- George, E. F. 1993. *Plant Propagation by Tissue Culture, Part 1, 2nd Edition*. Exegetics Limited, England.
- George, E. F., and Sherington, P. D. 1994. *Plant Propagation by Tissue Culture*. Exegetics Limited, England.
- George, E. F., M. A. Hall, and G. J. D. Klerk. 2008. The Components of Plant Tissue Culture Media II: Organic Additions, Osmotic and pH Effects, and Support Systems. *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition*: 115-173.
- Gunawan, L. W. 1992. *Teknik Kultur Jaringan Tumbuhan*. Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman PAU Bioteknologi IPB, Bogor.
- Hambali, M., F. Mayasari, dan F. Noermansyah. 2014. Ekstraksi Antosianin dari Ubi Jalar dengan Varian Konsentrasi Solven dan Lama Waktu Ekstraksi. *Teknik Kimia* 20(2): 25-35.
- Hardiyanto, A., Solichatun, dan W. Mudyantini. 2004. Pengaruh Variasi Konsentrasi Asam Naftalen Asetat Terhadap Pertumbuhan dan Kandungan Flavonoid Kalus Daun Dewa [*Gynura procumbens* (Lour) Merr.]. *Biofarmasi* 2(2): 69-74.
- Haris, M. 2011. Penentuan Kadar Flavonoid Total dan Aktivitas Antioksidan dari Daun Dewa (*Gynura pseudochina* (Lour) DC) dengan Spektrofotometer UV-Visibel. *Skripsi*. Universitas Andalas, Padang.
- Heim, K. E., A. R. Tagliaferro, and D. J. Bobilya. 2002. Flavonoid Antioxidants: Chemistry, Metabolism and Structure-Activity Relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry* 13: 572-584.
- Hendaryano, D. P. S., dan Wijayani, A. 1994. *Kultur Jaringan (Pengenal dan Petunjuk Perbanyak Tanaman Secara Vegetatif Media)*. Penerbit Kanisius, Yogyakarta.
- Heyne, K. 1987. *Tumbuhan Berguna Jilid III* diterjemahkan oleh Badan Litbang Kehutanan, Departemen Kehutanan, Yayasan Sarana Utama Jaya, Jakarta.
- Ibrahim, M. M., N. M. Arafa, and U. I. Aly. 2018. Antioxidant Activity, Phenol and

Flavonoid Contents of Plant and Callus Culture of *Plectranthus barbatus* andrews. *Egyptian Pharmaceutical Journal* 17(1): 32-39.

- Indah, P. N., dan Ermavitalini, D. 2013. Induksi Kalus Daun Nyamplung (*Calophyllum inophyllum* Linn.) pada Beberapa Kombinasi Konsentrasi 6-Benzylaminopurine (BAP) dan 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4- D). *Jurnal Sains dan Semi Pomits* 2(1): 1-6.
- Indrayanto, G. 1986. Prospek Kultur Jaringan Tanaman pada Bidang Farmasi. *Bulletin ISFI Jawa Timur* 17(1): 12-17.
- Intias, S. 2012. Pengaruh Pemberian Berbagai Konsentrasi 2,4-D dan BAP Terhadap Pembentukan Kalus Purwoceng (*Pimpinella pruatjan*) Secara *In-Vitro*. *Skripsi*. Universitas Sebelas Maret, Surakarta.
- Junairiah, J., N. S. Amalia, Y. S. W. Manuhara, N. Ni'matuzzahroh, dan L.Sulistyorini. 2019. Pengaruh Variasi Zat Pengatur Tumbuh IAA, BAP, Kinetin Terhadap Metabolit Sekunder Kalus Sirih Hitam (*Piper betle* L. Var Nigra). *Jurnal Kimia Riset* 4(2): 121-132.
- Khuril'ain, W. 2017. Pengaruh *Indole Acetic Acit* (IAA) Terhadap Pertumbuhan dan Kadar Lipida *Nannochloropsis oculata*. *Skripsi*. UIN Sunan Gunung Djati, Bandung.
- Koirewoa, Y. A., Fatimawali, dan W. I. Wiyono. 2012. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid dalam Daun Beluntas (*Pluchea indica* L.). *Pharmacon* 1(1): 47-52.
- Kubinova, R., M. Gazdova, Z. Hanakova, S. Jurkaninova, S. Dall'Acqua, J. Cvacka, and O. Humpa. 2018. New Diterpenoid Glucoside and Flavonoids from *Plectranthus scutellarioides* (L.) R. Br.. *South African Journal of Botany* 120: 1-5.
- Kurniasasari, I. 2006. Metode Cepat Penentuan Flavonoid Total Meniran (*Phyllanthus niruri* L.) Berbasis Teknik Spektrofotometri Inframerah dan Kemometrik. *Skripsi*. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Kusuma, A. T., A. Adelah, Z. Abidin, dan A. Najib. 2018. Penentuan Kadar Flavonoid Ekstrak Etil Asetat Daun Sukun (*Artocarpus altilis*). *Ad- Dawaa' Journal of Pharmaceutical Sciences* 1(1): 25-31.
- Kusumawati, E., Y. P. Sari, dan T. Purnaningsih. 2015. Pengaruh NAA dan BAP Terhadap Inisiasi Tunas Mengkudu (*Morinda citrifolia*) Secara *In Vitro*. *Jurnal Budidaya Tanaman Perkebunan* 1(1): 8-17.
- Lawalata, I. J. 2011. Pemberian Beberapa Kombinasi ZPT terhadap Regenerasi Tanaman Gloxinia (*Sinningia speciosa*) dari Eksplan Batang dan Daun secara *In Vitro*. *Journal of Experimental Life Science* 1(2): 83-87.
- Lenny, S., dan Marpaung, L. 2016. Senyawa Isoflavonoid dari Daun *Coleus Atropurpureus* Benth. *Seminar Nasional Kimia dan Pendidikan Kimia*, Sumatera Utara.
- Lizawati. 2012. Induksi Kalus Embriogenik dari Eksplan Tunas Apikal Tanaman Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L.) dengan Penggunaan 2,4-D dan TDZ. *Bioplantae* 1(2): 75-87.

- Lizawati, Neliyati, dan R. Desfira. 2012. Induksi Kalus Eksplan Daun Durian (*Durio zibethinus* Murr. cv. Selat Jambi) pada Beberapa Kombinasi 2,4-D dan BAP. *Indonesian Journal of Agronomy* 1(1): 19-25.
- Lomax, T. L., G. K. Muday, and P. H. Rubery. 1995. Auxin Transport. *Plant Hormones*: 509-530.
- Lumbessy, M., J. Abidjulu, dan J. J. E. Paendong. 2013. Uji Total Flavonoid pada Beberapa Tanaman Obat Tradisional di Desa Waitina Kecamatan Mangoli Timur Kabupaten Kepulauan Sula Provinsi Maluku Utara. *Jurnal MIPA UNSRAT Online* 2(1): 50-55.
- Maftuchah, A. H. K., dan Joko, B. S. 1998. Induksi Kalus *Artemisia* (*Artemisia vulgaris* L.) Melalui Kultur *In Vitro*. *Tropika* 6(2): 135-141.
- Mahadi, I., S. Wulandari, dan A. Omar. 2014. Pembentukan Kalus Tanaman Rosella (*Hibiscus sabdariffa*) pada Pemberian *Naftalen Acetyl Acid* (NAA) dan *Benzyl Amino Purin* (BAP) sebagai Sumber Belajar Konsep Bioteknologi. *Jurnal Biogenesis* 11(1): 1-6.
- Mahmuda, A. 2018. Pengaruh 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D) Terhadap Induksi Kalus dan Profi Metabolit Sekunder Kultur Kalus Sirih Hitam (*Piper betle* L. var. Nigra). *Skripsi*. Universitas Airlangga, Surabaya.
- Manthell, S. H., and Smith. 1983. *Cultural Factor that Influence Secondary Metabolites Accumulation in Plant Cell & Tissue Culture*. In : *Plant Biotechnology*. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- Manuhara, Y. S. W. 2001. Regenerasi Tanaman Sawi (*Brassica juncea* L.var Morakot) Melalui Teknik Kultur Jaringan. *Jurnal MIPA Universitas Airlangga* 6(2): 127-130.
- Massa, G. N. O. 2016. Pengaruh Variasi Konsentrasi Zat Pengatur Tumbuh *Dichlorophenoxyacetic Acid* (2,4-D) dan *Benzyl Adenine* (BA) Terhadap Induksi dan Kandungan Senyawa Metabolit Sekunder Kalus Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz dan Pav.). *Skripsi*. Universitas Airlangga, Surabaya.
- Maya, F. D. 2019. Pengaruh Kombinasi Konsentrasi Zat Pengatur Tumbuh 2,4-Dichlorophenoxy Acetic Acid (2,4-D) dan 6-Benzyl Amino Purine (BAP) Terhadap Induksi Kalus dan Profil Metabolit Sekunder Kultur Kalus Daun Tapak Liman (*Elephantopus scaber* L.). *Skripsi*. Universitas Airlangga, Surabaya.
- Mertens, R., J. Eberle, A. Arnscheidt, A. Ledebur, and E. W. Weiler. 1985. Monoclonal Antibodies to Plant Growth Regulators. II. Indole-3-acetic acid. *Planta* 166(3): 389-393.
- Moektiwardoyo, M., J. Levita, S. P. Sidiq, K. Ahmad, R. Mustarichie, A. Subarnas, dan Supriyatna. 2011. The Determination of Quercetin in *Plectranthus scutellarioides* (L.) R.Br. Leaves Extract and its *In Silico* Study on Histamine H4 Receptor. *Majalah Farmasi Indonesia* 22(3): 191-196.
- Moelyono, M. W., A. U. H. Rochjana, A. Diantini, I. Musfiroh, S. A. Sumiwi, Y. Iskandar,

- dan Y. Susilawati. 2016. Aktivitas Antioksidan Daun Iler *Plectranthus scutellarioides* (L.) R.Br. *Jurnal Farmasi Indonesia* 8(1):271-276.
- Mulja, M. 1990. *Aplikasi Spektrofotometer UV-VIS*. Mecphiso, Surabaya.
- Mustarichie, R., M. Moektiwardojo, and W. A. Dewi. 2017. Isolation, Identification, and Characteristic of Essential Oil of Iler (*Plectranthus scutellarioides* L.) R.Br Leaves. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 9(11): 2218-2223.
- Mutiatikum, D., S. Alegantina, dan Y. Astuti. 2010. Standarisasi Simplisia dari Buah Miana (*Plectranthus scutellarioides* (L) R.Brtrz) yang Berasal dari Tiga Tempat Tumbuh Menado, Kupan, dan Papua. *Buletin Penelitian Kesehatan* 38(1): 1-16.
- Nisa', Y. C. 2017. Pengaruh Kombinasi Zat Pengatur Tumbuh IAA, Kinetin, dan BAP Terhadap Pertumbuhan dan Perkembangan Eksplan Daun Sambung Nyawa (*Gynura procumbens* [Lour] Merr). *Skripsi*. Universitas Airlangga, Surabaya.
- Nurlaeni, Y., dan Surya, M. I. 2015. Respon Stek Pucuk *Camelia japonica* Terhadap Pemberian Zat Pengatur Tumbuh Organik. *Prosiding Seminar Nasional Masyarakat Biodiversifikasi Indonesia* 1(5): 1211-1215.
- Nurokhman, A., N. A. Tahani, H. Faizah, E. S. W. Utami, dan Y. S. W. Manuhara. 2018. Influence of Combination of Sucrose Concentration and Immersion Frequency on Biomass and Flavonoid Production of *Gynura procumbens* (Lour.) Merr Callus Culture in Temporary Immersion Bioreactor. *Scholars Academic Journal of Biosciences* 6(12): 748-754.
- Pakadang, S. E., C. U. Wahjuni, H. B. Notobroto, D. Winarni, R. Dwiyantri, Yadi, M. Sabir, and M. Hatta. 2015. Immunomodulator Potential of Miana Leaves (*Coleus scutellarioides* (L) Benth) in Prevention of Tuberculosis Infection. *American Journal of Microbiological Research* 3(4): 129-134.
- Park, W. K., Y. Gursong, M. Myoungsoon, W. K. Chul, E. C. Yoon, and Y. Ji- Won. 2013. Phytohormone Supplementation Significantly Increases Growth of *Chlamydomonas reinhardtii* Cultured for Biodiesel Production. *Appl Biochem Biotechnol* 171(5): 1128-1142.
- Parmana, D. 2015. Pengaruh Konsentrasi Hormon 2,4-D (2,4- *Dichlorophenoxyacetic acid*) Terhadap Induksi Kalus Daun Tembakau (*Nicotina tabacum* L.) Melalui Kultur *In Vitro*. *Skripsi*. Universitas Jember, Jember.
- Peryoga, L. W., Retnowati, dan B. Siswojo. 2015. Pengendalian Suhu Kelembaban Ruang Ekstraksi Metode Maserasi Minyak Atsiri Melati Kontroler PID Berbasis Arduino Mega. *Jurnal Mahasiswa TEUB* 3(1): 1-6.
- Pratiwi, A., A. F. Manurung, dan J. Sumitra. 2020. Penetapan Kadar Vitamin C pada Kulit Pisang (*Musa paradisiaca*) dengan Metode Spektrofotometri UV-Visible Tahun 2018. *Jurnal Farmasimed* 2(2): 56-62.
- Purnamaningsih, R., dan Ashrina, M. 2011. Pengaruh BAP dan NAA Terhadap Induksi Kalus dan Kandungan Artemisinin dari *Artemisia annua* L. *Berita Biologi* 10(4): 481-489.

- Purwaningsih, W., R. Kusdianti, dan Y. Linda. 2007. Anatomi Kalus yang Berasal dari Eksplan Daun *Catharanthus roseous* (L). G. Don (Tapak Dara). *Jurnal Seminar Nasional Bioteknologi*.
- Puteri, R. F., E. Ratnasari, dan Isnawati. 2014. Pengaruh Penambahan Berbagai Konsentrasi NAA (*Naphtalene Acetic Acid*) dan BAP (*Benzyl Amino Purine*) Terhadap Induksi Kalus Daun Sirsak (*Annona muricata*) Secara *In Vitro*. *Lentera Bio* 3(3): 154-159.
- Qalbi, A. N., J. Djangi, dan Muhaedah. 2017. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Ekstrak Klorofom Daun Tumbuhan Iler (*Coleus scutellarioides*, Linn, Benth). *Jurnal Chemica* 18(1): 48-55.
- Ragasa, Y., A. Vilma, F. Templora, and J. A. Rideout. 2001. Diastereomeric Diterpenes from *Coleus blumei*. *Bulletin Pharmacy Chemistry* 49(7):927-929.
- Rahayu, B., Solichatun, dan E. Anggarwulan. 2003. Pengaruh Asam 2,4-Diklorofenoksiasetat (2,4-D) Terhadap Pembentukan dan Pertumbuhan Kalus serta Kandungan Flavonoid Kultur Kalus *Acalypha indica* L. *Biofarmasi* 1(1): 1-6.
- Rahmawati, M., dan Hidajati, N. 2017. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder dari Ekstrak Metanol Kulit Batang Tumbuhan Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.). *UNESA Journal of Chemistry* 6(2): 113-118.
- Rao, R. 2002. Biotechnological Production of Phytopharmaceuticals. *J. Biochem. Mol. Bio. Biophys* 4: 73-102.
- Redha, A. 2010. Flavonoid: Struktur, Sifat Antioksidatif dan Peranannya dalam Sistem Biologis. *Jurnal Belian* 9(2): 196-202.
- Robinson, T. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. Edisi ke-4. Terjemahan Kosasih Padmawinata. ITB Press, Bandung.
- Rohyami, Y. 2008. Penentuan Kandungan Flavonoid dari Ekstrak Metanol Daging Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* Scheff Boerl). *Jurnal Logika* 5(1): 2-16.
- Salisbury, F. B., dan Ross, C. W. 1995. *Fisiologi Tumbuhan Jilid III*. Penerjemah: Kisman S., dan Ibrahim, S. ITB Press, Bandung.
- Santoso, U., dan Nursandi, F. 2003. *Kultur Jaringan Tanaman*. UMM Press, Malang.
- Setiawati, T., A. L. Astuti, M. Nurzaman, dan N. Ratningsih. 2021. Analisis Pertumbuhan dan Kandungan Total Flavonoid Kultur Kalus Krisan (*Chrysanthemum morifolium* Ramat) dengan Pemberian Asam 2,4-Diklorofenoksiasetat (2,4-D) dan Air Kelapa. *Jurnal Pro-Life: Jurnal Pendidikan Biologi, Biologi, dan Ilmu Serumpun* 8(1): 32-34.
- Shihab, M. Q. 2003. *Tafsir Al-Misbah; Pesan, Kesan, dan Keserasian Al-Qur'an Volume 7*. Lentera Hati, Jakarta.
- Silalahi, M. 2015. Pengaruh Modifikasi Media Murashige-Skoog (MS) dan Zat Pengatur

- Tumbuh BAP terhadap Pertumbuhan Kalus *Centella asiatica* L.(Urban.). *Jurnal Pro Life* 2(1): 14-23.
- Silva, J. A. T. 2012. Is BA (6-Benzyladenine) BAP (6-Benzylaminopurine)?. *The Asian and Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology* 20(4): 121-124.
- Siregar, C. 2006. Penggunaan 2,4-D untuk Inisiasi Kalus Jaringan Nucellus *Mangifera odorata* Griff. Melalui Budidaya Jaringan. *Jurnal Floratek* 2(2): 69-77.
- Sitompul, S. M., dan Guritno, B. 1995. *Analisis Pertumbuhan Tanaman*. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- Slimestad, R., K. Torskangerpoll, H. S. Nateland, T. Johannessen, and N. H. Giske. 2005. Flavonoid from Black Chokeberries, *Aronia melanocarpa*. *Journal of Food Composition and Analysis* 18(1): 61-68.
- Sorentina, M. S. M., Haliani, Muslimin, dan I. N. Suwastika. 2013. Induksi Kalus Bawang Merah (*Allium ascalonicum* L.) Lokal Palu pada Medium MS dengan Penambahan 2,4-D (2,4-Asam Dikloropenoksi Asetat) dan Air Kelapa. *Online Journal of Natural Science* 2(2): 55-63.
- Stankovic, M. 2011. Total Phenolic Content, Flavonoid Concentration and Antioxidant Activity of *Marrubium peregrinum* L. Extract. *Krajuevac Journal Science*: 63-72.
- Sudrajad, H., dan Suryanto. 2011. Pengaruh Penambahan Sitokinin pada Senyawa Flavonoid Kalus (*Echinacea purpurea* L.). *Jurnal Ilmu Farmasi dan Farmasi Klinik*: 102-107.
- Sugiyarto, L. Dan Kuswandi, P. C. 2014. Pengaruh 2,4-Diklorofenoksiasetat (2,4-D) dan Benzyl Aminopurin (BAP) Terhadap Pertumbuhan Kalus Daun Binahong (*Anredera cordifolia* L.) serta Analisis Kandungan Flavonoid Total. *Jurnal Saintek*:1-5.
- Suheb, N. A. 2018. Induksi Kalus *Agave sisalana* pada Media MS dengan Kombinasi Konsentrasi 6-Benzylaminopurin (BAP) dan 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D). *Skripsi*. Universitas Muhammadiyah Malang, Malang.
- Suprpto, A. 2004. Auksin: Zat Pengatur Tumbuh Penting Meningkatkan Mutu Stek Tanaman. *Jurnal Penelitian Inovasi* 21(1): 81-90.
- Surtinah, 2017. Potensi Hasil Jagung Manis (*Zea mays saccharata*, Strut) dengan Pemberian Paket Teknologi Pupuk dan Zat Pengatur Tumbuh. *Jurnal Bibiet* 2(1): 37-44.
- Trivedi, M. K., A. Branton, D. Trivedi, G. Nayak, K. Bairwa, and S. Jana. 2015. Physical, Thermal, and Spectroscopic Characterization of Biofield Energy Treated Murashige and Skoog Plant Cell Culture Media. *Cell Biology* 3(4): 50-57.
- Tungmunnithum, D., L. Garros, S. Drouet, S. Renouard, E. Laine, and C. Hano. 2019. Green Ultrasound Assited Extraction of *trans* Rosmarinic Acid from *Plectranthus scutellarioides* (L.) R.Br. Leaves. *Plants* 8(3): 1-15.

- Utomo, B. 2015. Pengaruh Kombinasi Zat Pengatur Tumbuh *Naphthalene Acetic Acid* (NAA) dan Kinetin Terhadap Pembentukan dan Kandungan Metabolit Sekunder Kalus Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz dan Pav.). *Skripsi*. Universitas Airlangga, Surabaya.
- Vikayanti. 2015. *Khasiat Iler (Coleus scutellarioides* Linn. Benth) sebagai Pestisida Nabati. Fungsional POPT BBPPTP, Surabaya.
- Wardani, D. P., Solichatun, dan A. D. Setyawan. 2004. Pertumbuhan dan Produksi Saponin Kultur Kalus *Talinum paniculatum* Gaertn. pada Variasi Penambahan Asam 2,4-Diklorofenoksi Asetat (2,4-D) dan Kinetin. *Biofarmasi* 2(1): 35-43.
- Wareing, P. F., and Phillips, I. D. J. 1981. *Growth and Differentiation in Plants (3rd edn)*. Pergamon Press, Oxford.
- Waryastuti, D. E., L. Setyobudi, dan T. Wardiyati. 2017. Pengaruh Tingkat Konsentrasi 2,4-D dan BAP pada Media MS Terhadap Induksi Kalus Embriogenik Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.). *Jurnal Produksi Tanaman* 5(1): 140-149.
- Wattimena, G. A. 1991. *Zat Pengatur Tumbuh Tanaman*. Pusat Antar Universitas, ITB Bogor.
- Wattimena, G. A. 2006. Kecenderungan Marginalisasi Peran Kultur Jaringan dalam Pemuliaan Tanaman. *Prosiding Seminar Nasional Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman*, Bogor.
- Wijaya, M. I. 2012. Penentuan Jenis Eksplan dan Konsentrasi Asam 2,4-Diklorofenoksiasetat pada Induksi Kalus Krisan (*Chrysanthemum morifolium* Ramat) cv. Puspita Pelangi Sebagai Sumber Flavonoid. *Skripsi*. Universitas Atma Jaya, Yogyakarta.
- Woodward, A. W., and Bartel, B. 2005. Auxin: Regulation, Action, and Interaction. *Annals of Botany* 95(5): 707-735.
- Wulandari, S., W. Syafii, dan Yossilia. 2004. Respon Eksplan Daun Tanaman Jeruk Manis (*Citrus sinensis* L.) Secara In Vitro Akibat Pemberian NAA dan BA. *Jurnal Biogenesis* 1(1): 21-25.
- Yuliarti, N. 2010. *Kultur Jaringan Tanaman Skala Rumah Tangga*. Lily Publisher, Yogyakarta.
- Yusnita. 2003. *Kultur Jaringan Cara Memperbanyak Tanaman Secara Efisien*. Agromedia Pustaka, Jakarta.
- Zaerr, J. B., and Mapes, M. O. 1982. Action of Growth Regulators. *Tissue Culture in Forestry*: 231-255.
- Zulraufianti, L., dan Paserang, A. P. 2019. Induksi Kalus Kentang Asal Desa Dombu (*Solanum tuberosum* L.) dengan ZPT Indole-3-Acetic Acid (IAA). *Journal of Science and Technology* 8(2): 153-158.

