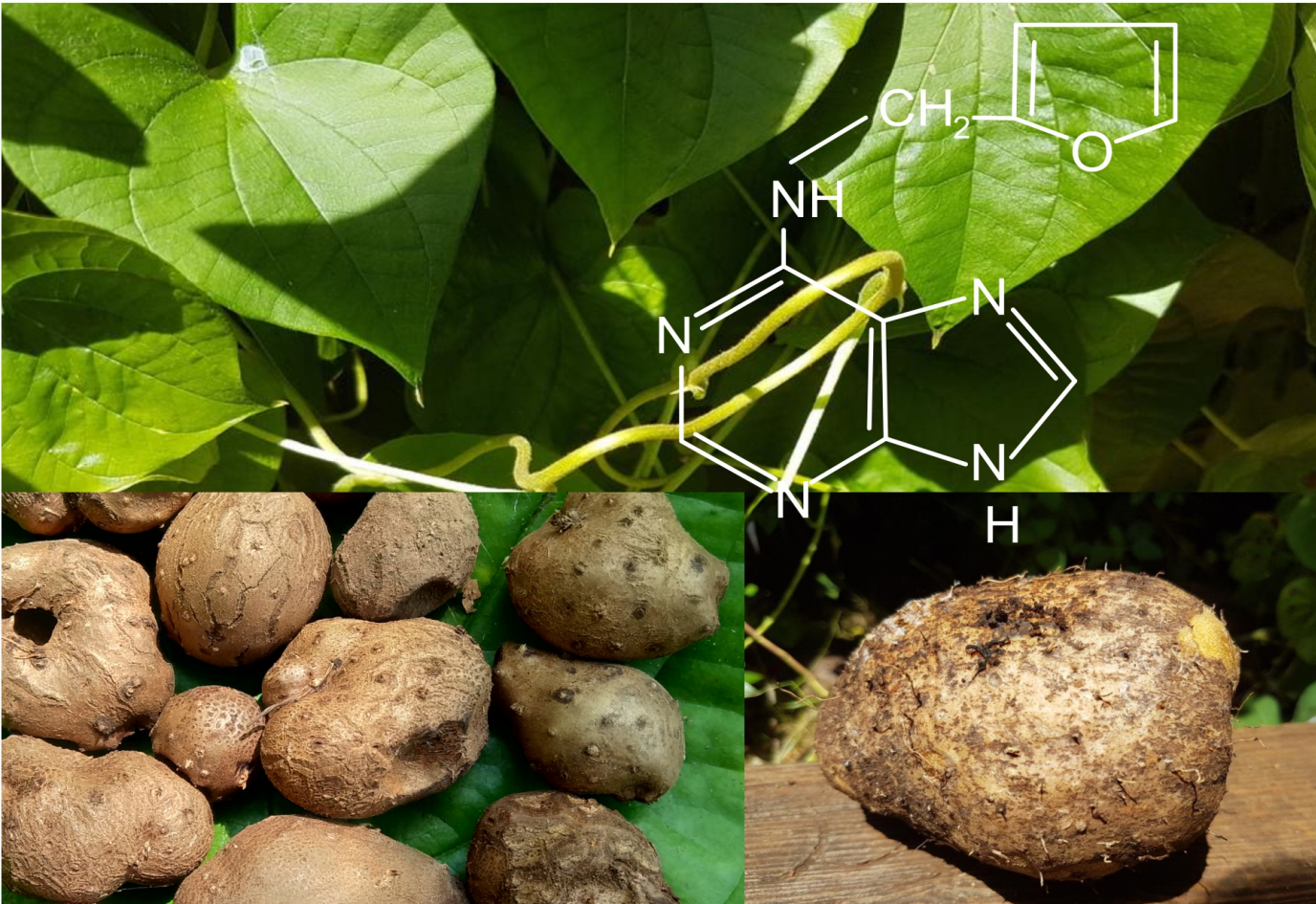


Dr. Noor Aini Habibah, S.Si., M.Si.



# PRODUKSI SENYAWA BIOAKTIF DARI KULTUR KALUS GEMBILI (*Dioscorea Esculenta*)

Editor: Prof. Dr. Ari Yuniastuti, M.Biomed  
Profesor Bidang Nutrigenomik dan Kajian Senyawa  
Bioaktif Tanaman Biologi, FMIPA Unnes



**PRODUKSI SENYAWA BIOAKTIF  
DARI KULTUR KALUS GEMBILI  
(*Dioscorea esculenta*)**

## UU No 28 tahun 2014 tentang Hak Cipta

### **Fungsi dan sifat hak cipta Pasal 4**

Hak Cipta sebagaimana dimaksud dalam Pasal 3 huruf a merupakan hak eksklusif yang terdiri atas hak moral dan hak ekonomi.

### **Pembatasan Pelindungan Pasal 26**

Ketentuan sebagaimana dimaksud dalam Pasal 23, Pasal 24, dan Pasal 25 tidak berlaku terhadap:

- i. Penggunaan kutipan singkat Ciptaan dan/atau produk Hak Terkait untuk pelaporan peristiwa aktual yang ditujukan hanya untuk keperluan penyediaan informasi aktual;
- ii. Penggandaan Ciptaan dan/atau produk Hak Terkait hanya untuk kepentingan penelitian ilmu pengetahuan;
- iii. Penggandaan Ciptaan dan/atau produk Hak Terkait hanya untuk keperluan pengajaran, kecuali pertunjukan dan Fonogram yang telah dilakukan Pengumuman sebagai bahan ajar; dan
- iv. Penggunaan untuk kepentingan pendidikan dan pengembangan ilmu pengetahuan yang memungkinkan suatu Ciptaan dan/atau produk Hak Terkait dapat digunakan tanpa izin Pelaku Pertunjukan, Produser Fonogram, atau Lembaga Penyiaran.

### **Sanksi Pelanggaran Pasal 113**

1. Setiap Orang yang dengan tanpa hak melakukan pelanggaran hak ekonomi sebagaimana dimaksud dalam Pasal 9 ayat (1) huruf i untuk Penggunaan Secara Komersial dipidana dengan pidana penjara paling lama 1 (satu) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp100.000.000 (seratus juta rupiah).
2. Setiap Orang yang dengan tanpa hak dan/atau tanpa izin Pencipta atau pemegang Hak Cipta melakukan pelanggaran hak ekonomi Pencipta sebagaimana dimaksud dalam Pasal 9 ayat (1) huruf c, huruf d, huruf f, dan/atau huruf h untuk Penggunaan Secara Komersial dipidana dengan pidana penjara paling lama 3 (tiga) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp500.000.000,00 (lima ratus juta rupiah).

**Dr. Noor Aini Habibah, S.Si., M.Si.**  
**Editor : Prof. Dr. Ari Yuniastuti, M.Biomed.**

**PRODUKSI SENYAWA BIOAKTIF  
DARI KULTUR KALUS GEMBILI  
(*Dioscorea esculenta*)**



**PRODUKSI SENYAWA BIOAKTIF  
DARI KULTUR KALUS GEMBILI (DIOSCOREA ESCULENTA)**

**Noor Aini Habibah**

Editor :

**Ari Yuniastuti**

Desain Cover :

**Herlambang Rahmadhani**

Sumber :

<https://www.shutterstock.com>

Tata Letak :

**Gofur Dyah Ayu**

Proofreader :

**Mira Muarifah**

Ukuran :

**xvi, 75 hlm, Uk: 15.5x23 cm**

ISBN :

**978-623-02-3362-3**

Cetakan Pertama :

**September 2021**

Hak Cipta 2021, Pada Penulis

---

Isi diluar tanggung jawab percetakan

---

**Copyright © 2021 by Deepublish Publisher**  
All Right Reserved

Hak cipta dilindungi undang-undang  
Dilarang keras menerjemahkan, memfotokopi, atau  
memperbanyak sebagian atau seluruh isi buku ini  
tanpa izin tertulis dari Penerbit.

**PENERBIT DEEPUBLISH**  
**(Grup Penerbitan CV BUDI UTAMA)**

Anggota IKAPI (076/DIY/2012)

Jl.Rajawali, G. Elang 6, No 3, Drono, Sardonoharjo, Ngaglik, Sleman  
Jl.Kaliurang Km.9,3 – Yogyakarta 55581

Telp/Faks: (0274) 4533427

Website: [www.deepublish.co.id](http://www.deepublish.co.id)

[www.penerbitdeepublish.com](http://www.penerbitdeepublish.com)

E-mail: [cs@deepublish.co.id](mailto:cs@deepublish.co.id)

# PRAKATA

Penelitian di bidang kultur jaringan telah berkembang dengan pesat. Aplikasi teknik kultur jaringan tidak hanya sebatas perbanyakkan tanaman tetapi juga produksi metabolit sekunder yang berpotensi sebagai obat atau bahan kosmetik. Teknik kultur jaringan untuk produksi metabolit sekunder telah banyak diaplikasikan di berbagai industri obat dan kosmetik di banyak negara. Di Indonesia, aplikasi teknik kultur jaringan masih terbatas pada perbanyakkan tanaman. Penggunaan teknik ini di industri obat dan kosmetik di Indonesia untuk produksi metabolit sekunder masih belum berkembang. Padahal Indonesia sangat kaya akan tanaman yang berpotensi sebagai bahan obat dan kosmetik yang produksinya dapat lebih stabil jika dilakukan menggunakan teknik kultur jaringan.

Buku ini disusun sebagai salah satu upaya untuk mengenalkan hasil penelitian penulis berkaitan dengan teknik kultur jaringan tumbuhan dalam aplikasi produksi senyawa bioaktif. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan kondisi optimal untuk produksi senyawa bioaktif tanaman gembili (*Dioscorea esculenta*) secara *in vitro*. Tanaman gembili yang selama ini dikenal masyarakat hanya sebagai bahan pangan, ternyata mengandung senyawa bioaktif dan mempunyai aktivitas antioksidan. Berdasarkan hasil penelitian ini diketahui bahwa kalus dapat menghasilkan senyawa bioaktif dan juga menunjukkan aktivitas antioksidan. Kondisi optimal yang telah diketahui dapat menjadi pijakan ilmiah bagi produksi senyawa bioaktif dari tanaman gembili secara *in vitro*. Penelitian ini memiliki kebaharuan penggunaan umbi dari tanaman gembili sebagai eksplan untuk induksi kalus. Tahapan produksi senyawa bioaktif menggunakan kultur kalus dari tanaman gembili dijelaskan secara rinci pada buku ini yang terbagi menjadi 5 bab.

Harapan kami buku monograf ini akan bermanfaat untuk lebih mengenalkan aplikasi kultur jaringan dalam produksi senyawa bioaktif dan juga mendorong lebih banyak penelitian yang berkaitan dengan tanaman-tanaman yang ada di Indonesia sebagai bahan obat dan kosmetik. Buku ini masih jauh dari sempurna, untuk itu penulis mengharapkan kritik dan saran membangun dari pembaca.

Semarang, 2021

Penulis

# KATA PENGANTAR

Syukur *alhamdulillahirobbilalamin*. Segala puji bagi Allah, yang Maha Pengasih dan Maha Penyayang. Tiada kekuatan selain atas izin Allah serta hanya atas rahmat dan rida Allah yang Maha Pengasih dan Maha Penyayang, sehingga terwujud monograf berjudul ***Produksi Senyawa Bioaktif dari Kultur Kalus Gembili (Dioscorea esculenta)***, merupakan rangkaian tulisan hasil penelitian yang disajikan oleh penulis.

Saya secara pribadi mengapresiasi dan mengucapkan selamat kepada penulis atas ketekunan, tekad dan semangat dalam melakukan penelitian dan menuangkan hasilnya dalam tulisan hingga terwujud buku monograf ini. Penulis buku monograf ini merupakan pakar di bidang kultur jaringan, memiliki catatan penelitian yang solid serta pengalaman yang luas tentang kultur jaringan.

Baik profesional kesehatan maupun masyarakat umum menyadari bahwa senyawa bioaktif dari suatu tanaman sangat penting untuk kesehatan. Senyawa bioaktif tanaman saat ini merupakan topik kesehatan di mana masyarakat awam menerima informasi dari buku-buku populer dan majalah, tetapi belum mendapatkan informasi tentang cara memperoleh senyawa bioaktif tersebut. Oleh karena itu penting untuk memberikan informasi yang dapat dipercaya dan tersedia tentang proses produksi senyawa bioaktif dari sumber bahan pangan lokal. Monograf ini memberikan semua informasi mengupas tuntas tentang produksi senyawa bioaktif dari umbi gembili (*Dioscorea esculenta*).

Setiap bab dalam monograf ini menyajikan penjelasan yang sangat membantu untuk dapat memahami proses produksi senyawa bioaktif dan aktivitas antioksidan dari umbi gembili melalui metode kultur jaringan. Transfer pengetahuan dari hasil penelitian yang dituangkan dalam monograf ini dapat sebagai jembatan antara integrasi pengetahuan dari



informasi yang dipelajari sebelumnya dengan praktik yang ada di lapangan.

Semoga monograf ini dapat dijadikan sebagai dasar pengembangan ilmu pengetahuan di bidang pangan, kesehatan, dan bidang-bidang lain yang terkait. Serta pembaca dapat memanfaatkan informasi dalam monograf ini untuk diterapkan dalam kehidupan sehari-hari.

Semarang, 14 Agustus 2021

Ari Yuniastuti

Profesor Bidang Nutrigenomik dan Kajian  
senyawa bioaktif tanaman  
Biologi, FMIPA Unnes

# KATA PENGANTAR PENERBIT

*Assalamualaikum, wr. wb.*

Puji syukur kami panjatkan ke hadirat Allah Swt., karena atas rahmat dan karunia-Nya Penerbit Deepublish masih ikut berikhtiar dalam mencerdaskan dan memuliakan umat manusia untuk memanfaatkan ilmu pengetahuan dan teknologi. Salah satunya adalah dengan menerbitkan sebuah buku berjudul *Produksi Senyawa Bioaktif dari Kultur Kalus Gambili (Dioscorea esculenta)* ini.

Buku ini didasarkan pada penelitian penulis terkait dengan teknik kultur jaringan tumbuhan dalam aplikasi produksi senyawa bioaktif. Melalui pemaparan informasi yang jelas, menyeluruh dan faktual mengenai proses produksi senyawa bioaktif dari sumber bahan pangan lokal, umbi gambili (*Dioscorea esculenta*). Sehingga informasi yang termuat dapat dipelajari oleh praktikan bioteknologi di lapangan.

Kami mengucapkan terima kasih kepada penulis buku, Noor Aini Habibah, yang telah memberikan perhatian, kepercayaan dan kontribusi demi kesempurnaan buku ini. Serta kepada pihak-pihak lainnya yang terus menjadi inspirasi dan memberikan semangat dalam menerbitkan buku yang berkualitas dan bermanfaat.

Kami sadar masih terdapat berbagai kekurangan dalam buku ini. Namun, kami mencoba untuk terus mengembangkan diri, dan mencoba memperkecil kesalahan-kesalahan. Semoga buku ini dapat memperkaya khazanah dan memberi manfaat bagi para pembaca.

*Wassalamualaikum, wr. wb.*

Hormat Kami,

Penerbit Deepublish

# DAFTAR ISI

PRAKATA .....	v
KATA PENGANTAR .....	vii
KATA PENGANTAR PENERBIT.....	ix
DAFTAR ISI .....	x
DAFTAR GAMBAR .....	xii
DAFTAR TABEL.....	xv
<b>BAB I      PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Permasalahan.....	4
1.3. Tujuan .....	5
1.4. Manfaat.....	5
<b>BAB II     TINJAUAN TEORI.....</b>	<b>6</b>
2.1. Tanaman Gembili ( <i>Dioscorea esculenta</i> ) .....	6
2.1.1. Klasifikasi .....	6
2.1.2. Morfologi .....	6
2.1.3. Biokimia.....	8
2.2. Flavonoid dan Fenolik .....	10
2.3. Antioksidan .....	13
2.4. Kultur Jaringan Sebagai Metode Produksi Metabolit Sekunder.....	14
2.4.1. Faktor yang Mempengaruhi Produksi Metabolit Sekunder Melalui Kultur Jaringan .....	14
2.4.2. Produksi Metabolit Sekunder pada Kalus .....	20

<b>BAB III</b>	<b>METODE PENELITIAN .....</b>	<b>28</b>
3.1.	Alat dan Bahan.....	28
3.1.1.	Alat .....	28
3.1.2.	Bahan.....	29
3.2.	Variabel Penelitian.....	30
3.2.1.	Variabel Bebas.....	30
3.2.2.	Variabel Terikat.....	30
3.2.3.	Variabel Kendali.....	30
3.3.	Rancangan Penelitian.....	31
3.4.	Alur Penelitian .....	31
3.4.1.	Pembuatan Media Murashige and Skoog (MS).....	32
3.4.2.	Sterilisasi Alat dan Media.....	33
3.4.3.	Sterilisasi Eksplan dan Penanaman .....	33
3.4.4.	Inkubasi .....	33
3.4.5.	Penentuan Berat Kering Sampel .....	34
3.4.6.	Metode Analisis Kandungan Senyawa Bioaktif dan Penentuan Aktivitas Antioksidan.....	34
3.4.7.	Analisis Data.....	36
<b>BAB IV</b>	<b>HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>37</b>
4.1.	Induksi Kalus .....	37
4.2.	Kandungan Flavonoid dan Fenolik .....	49
4.3.	Aktivitas Antioksidan .....	54
4.4.	Pembahasan secara umum.....	56
<b>BAB V</b>	<b>SIMPULAN .....</b>	<b>61</b>
	DAFTAR PUSTAKA.....	62
	GLOSARIUM .....	74

# DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Batang dan daun tumbuhan gembili .....	7
Gambar 2.2	Umbi Gembili (Retnowati et al., 2018). .....	7
Gambar 2.3	Morfologi umbi delapan aksesi gembili Papua.....	8
Gambar 2.4	Struktur kelas utama flavonoid.....	10
Gambar 2.5	Jalur utama biosintesis flavonoid pada tanaman .....	11
Gambar 2.6	Mekanisme transpor flavonoid di dalam sel tumbuhan.....	12
Gambar 2.7	Model hipotesis aktivasi gen oleh IAA.....	17
Gambar 2.8	Struktur kimia zat pengatur tumbuh 2,4-D .....	19
Gambar 2.9	Struktur kimia zat pengatur tumbuh kinetin .....	19
Gambar 2.10	Mekanisme pembentukan kalus.....	21
Gambar 2.11	Induksi pembelahan oleh auksin dan sitokinin .....	23
Gambar 3.1	Umbi gembili yang digunakan sebagai eksplan.....	29
Gambar 3.2.	Alur Penelitian yang dilakukan .....	31
Gambar 3.3	Tempat inkubasi untuk induksi kalus gembili .....	33
Gambar 4.1.	Kalus mulai terbentuk pada bagian eksplan yang terluka .....	40
Gambar 4.2	Kalus <i>Dioscorea esculenta</i> umur 3 bulan yang dipelihara pada medium MS dengan penambahan 2,4-D dan kinetin dalam kondisi gelap .....	41

Gambar 4.3	Kalus <i>Dioscorea esculenta</i> umur 4 bulan yang dipelihara pada medium MS dengan penambahan 2,4-D dan kinetin dalam kondisi gelap.....	41
Gambar 4.4	Kalus <i>Dioscorea esculenta</i> umur 3 bulan yang dipelihara pada medium MS dengan penambahan 2,4-D dan kinetin dalam kondisi terang .....	42
Gambar 4.5	Kalus <i>Dioscorea esculenta</i> umur 4 bulan yang dipelihara pada medium MS dengan penambahan 2,4-D dan kinetin dalam kondisi terang .....	42
Gambar 4.6	Berat kering kalus gembili umur 3 bulan yang dipelihara pada medium MS dengan penambahan 2,4-D dan kinetin pada kondisi terang dan gelap. ....	43
Gambar 4.7	Berat kering kalus gembili umur 4 bulan yang dipelihara pada medium MS dengan penambahan 2,4-D dan kinetin pada kondisi terang dan gelap .....	46
Gambar 4.8	Kandungan flavonoid dari kalus gembili umur 3 bulan yang dipelihara pada medium MS dengan penambahan 2,4-D dan kinetin pada terang dan gelap .....	50
Gambar 4.9	Kandungan flavonoid dari kalus gembili umur 4 bulan yang dipelihara pada medium MS dengan penambahan 2,4-D dan kinetin pada terang dan gelap .....	51
Gambar 4.10	Kandungan fenolik dari kalus gembili umur 3 bulan yang dipelihara pada medium MS dengan penambahan 2,4-D dan kinetin pada kondisi terang dan gelap.....	52
Gambar 4.11	Kandungan fenolik dari kalus gembili umur 4 bulan yang dipelihara pada medium MS dengan penambahan 2,4-D dan kinetin pada kondisi terang dan gelap.....	53

Gambar 4.12	Aktivitas antioksidan kalus gembili umur 3 bulan yang dipelihara pada medium MS dengan penambahan 2,4-D dan kinetin pada kondisi terang dan gelap .....	54
Gambar 4.13	Aktivitas antioksidan kalus gembili umur 4 bulan yang dipelihara pada medium MS dengan penambahan 2,4-D dan kinetin pada kondisi terang dan gelap .....	55

# DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Hasil Analisis Komposisi Zat Gizi Gembili Mentah, Rebus, Kukus, dan Goreng.....	8
Tabel 3.1	Alat-Alat Penelitian.....	28
Tabel 3.2	Bahan-Bahan Penelitian .....	29
Tabel 3.3	Komposisi medium MS.....	32
Tabel 4.1	Berat kering kalus gembili umur 3 bulan yang dipelihara pada medium MS dengan penambahan 2,4-D dan kinetin pada kondisi terang dan gelap.....	44
Tabel 4.2	Hasil uji statistik perbandingan berat kering berdasarkan kondisi.....	44
Tabel 4.3	Hasil uji statistik perbandingan berat kering berdasarkan perlakuan.....	44
Tabel 4.4	Hasil uji statistik perbandingan berat kering berdasarkan kondisi dan perlakuan yang diberikan .....	45
Tabel 4.5	Berat kering kalus gembili umur 4 bulan yang dipelihara pada medium MS dengan penambahan 2,4-D dan kinetin pada kondisi terang dan gelap.....	46
Tabel 4.6	Hasil uji statistik perbandingan berat kering berdasarkan kondisi.....	47
Tabel 4.7	Hasil uji statistik perbandingan berat kering berdasarkan perlakuan.....	47
Tabel 4.8	Hasil uji statistik Perbandingan berat kering berdasarkan kondisi dan perlakuan yang diberikan .....	48





# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang

Metabolit sekunder meskipun tidak sangat penting bagi eksistensi suatu individu, sering berperan pada kelangsungan hidup suatu spesies. Salah satu metabolit sekunder yang banyak dihasilkan oleh tumbuhan adalah fenolik. Fenolik pada tumbuhan terdiri atas fenol, lignin, kumarin, lignan, tannin, flavonoid dan asam fenolik (Soto-Vaca *et al.*, 2012). Senyawa fenolik dilaporkan mempunyai berbagai efek biologis termasuk antikanker, antivirus, antioksidan dan antiinflamasi. Asam fenolik juga dilaporkan menghambat kanker kolon (Rosa *et al.*, 2016). Metabolit sekunder lain yang juga banyak dihasilkan oleh tumbuhan adalah flavonoid. Flavonoid merupakan metabolit sekunder yang mempunyai kemampuan bioaktif dan ditemukan pada berbagai bagian tumbuhan. Pada tumbuhan, flavonoid mempunyai fungsi yang penting antara lain dalam integritas struktur tumbuhan, proses reproduksi, fotoproteksi terhadap UV, pengaturan internal fisiologi dan *signaling* sel tumbuhan (Ferreira *et al.*, 2012). Flavonoid yang mempunyai aktivitas antioksidan secara efektif juga mengontrol tahap kunci pada pertumbuhan dan diferensiasi sel sehingga dapat mengatur perkembangan keseluruhan tumbuhan dan organ secara individual (Agati *et al.*, 2012). Kemampuan bioaktif flavonoid yang bermanfaat bagi manusia sangat bervariasi antara lain sebagai antioksidan, antikanker, antiasam urat, antihipertensi dan antibakteri (Purwatiningsih *et al.*, 2010; Cassidy *et al.*, 2011, Khan *et al.*, 2013).

Gembili banyak dimanfaatkan oleh masyarakat sebagai sumber pangan. Umbi gembili juga dilaporkan mengandung senyawa bioaktif berupa dioscorin, diosgenin, saponin, confusarin, nudol, fenolik, tannin, flavonoid dan alkaloid. Senyawa bioaktif yang terdapat dalam gembili

berperan sebagai *immunomodulator*, mencegah penyakit metabolik, mencegah inflamasi, mencegah kanker, aktivitas antioksidan dan modulator hormon (Okwu & Ndu, 2006, Senanayake *et al.*, 2012), Shajeela *et al.*, 2011, Prabowo *et al.*, 2014, Aminah *et al.*, 2017, Lee *et al.*, 2017). Anggota genus *Disocorea* dilaporkan mengandung metabolit sekunder saponin, alkaloid, flavonoid, tannin, dan fenol.

Kultur jaringan tumbuhan merupakan teknik kultivasi *in vitro* secara aseptik dari bagian tumbuhan (Hapsoro & Yusnita, 2018). Teknik ini berkembang karena adanya teori sel dan teori totipotensi sel. Teori totipotensi sel menyatakan bahwa sel tumbuhan memiliki kemampuan tumbuh dan berkembang membentuk individu baru serta mampu melakukan metabolisme seperti tanaman induknya bila dipelihara pada lingkungan yang tepat. Sifat genetik yang terkandung pada setiap sel tumbuhan menyebabkan sel tersebut dapat membentuk senyawa kimia tertentu yang sama dengan yang dibentuk tanaman induknya. Pada setiap sel tumbuhan terkandung sifat genetik dan fisiologi yang penting untuk pembentukan senyawa kimia tertentu yang sama dengan yang dibentuk tanaman induknya. Kemampuan totipotensi dan plastisitas atau kelenturan morfogenetik sel tumbuhan menjadi dasar berkembangnya teknik kultur jaringan. Teknik kultur jaringan saat ini telah berkembang dengan pesat dan dimanfaatkan untuk berbagai tujuan.

Aplikasi kultur jaringan tumbuhan antara lain:

1. Perbanyak tumbuhan
2. Produksi metabolit sekunder dari tumbuhan
3. Pelestarian tumbuhan
4. Perbaiki mutu tumbuhan

Penerapan kultur jaringan tumbuhan dalam produksi metabolit sekunder mempunyai beberapa keuntungan dibandingkan dengan penggunaan tanaman secara langsung.

Keuntungan-keuntungan tersebut, antara lain:

1. senyawa bioaktif yang diproduksi melalui metode kultur jaringan dapat dihasilkan dalam kondisi terkontrol dan waktu yang relatif lebih singkat,
2. setiap sel dapat diatur perbanyakannya untuk mendapatkan metabolit sekunder yang diinginkan,

3. pertumbuhan sel terawasi dan proses metabolismenya dapat diatur secara rasional,
4. Metode kultur jaringan tidak bergantung kepada kondisi lingkungan seperti keadaan geografi, iklim dan musim.
5. Produksi dapat diseragamkan
6. hasil dan mutu produksi lebih mantap dan stabil
7. efisiensi penggunaan lahan
8. dapat menghasilkan metabolit jenis lain selain jenis pokok

Selain banyak keunggulan, produksi metabolit sekunder secara *in vitro* juga mempunyai kelemahan. Kelemahan produksi metabolit sekunder secara *in vitro* antara lain:

1. Metabolit sekunder tertentu tidak dapat diproduksi secara *in vitro*
2. Produksi metabolit sekunder secara *in vitro* umumnya rendah
3. Proses produksi memerlukan alat, bahan dan tenaga ahli khusus sehingga biaya produksi tinggi.
4. Metabolit diproduksi pada jaringan yang terdiferensiasi
5. Melibatkan jalur yang kompleks dengan langkah yang sulit untuk dimanipulasi
6. Metabolit sekunder dari tanaman yang jarang, dan sulit dikultivasi
7. Kesulitan dalam sekresi dan purifikasi metabolit sekunder

Produksi senyawa bioaktif melalui kultur jaringan umumnya dilakukan melalui kultur kalus dan kultur suspensi sel. Produksi senyawa bioaktif pada kultur kalus telah banyak dilaporkan. Kalus *Dalbergia congestiflora* dapat menghasilkan medicarpin (Hernández-García *et al.*, 2021), kultur kalus padi dilaporkan dapat menghasilkan Senyawa antikanker (Deshpande *et al.*, 2011). Kultur kalus *Vigna unguiculata* dapat menghasilkan senyawa yang mempunyai kemampuan antioksidan (Vats., 2012), dan produksi senyawa bioaktif fenolik antara lain dilaporkan pada kalus *Byrsonima verbascifolia* (Castro *et al.*, 2016).

Pertumbuhan kalus dan produksi metabolit sekunder pada kultur kalus dipengaruhi antara lain oleh zat pengatur tumbuh dan kondisi kultur. Zat pengatur tumbuh yang diperlukan untuk induksi kalus berbeda-beda tergantung jenis eksplan dan spesies tumbuhan (Veraplakorn, 2016, Singh *et al.*, 2014, Habibah *et al.*, 2016, Habibah *et al.*, 2018, Habibah *et al.*,

2019, Habibah *et al.*, 2020). Kultur kalus *Stelechocarpus burahol* yang diinduksi pada medium MS dengan penambahan Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) yang berbeda menghasilkan konsentrasi flavonoid yang berbeda (Habibah *et al.*, 2016). Hal ini juga terjadi pada kalus *Elaeocarpus grandiflorus* (Habibah *et al.*, 2018, Habibah *et al.*, 2020). Zat pengatur tumbuh yang digunakan untuk induksi kalus umumnya adalah kombinasi antara auksin dan sitokinin (Hapsoro & Yusnita, 2018). Induksi kalus memerlukan rasio auksin dan sitokinin seimbang. Kombinasi yang tepat antara auksin dan sitokinin menghasilkan kalus dengan pertumbuhan yang optimal (Kurniawan & Wahyu, 2016). Tripathi *et al.* (2012) juga melaporkan bahwa pada induksi kalus *Calotropis gigantea* keseimbangan rasio auksin dan sitokinin memberikan hasil yang lebih baik untuk induksi kalus. Penggunaan 2,4-D dan kinetin telah banyak digunakan untuk induksi kalus karena keberhasilan yang tinggi (Saikin *et al.*, 2013, Vats & Kamal, 2014).

Produksi metabolit sekunder juga dipengaruhi faktor lingkungan antara lain pencahayaan. Pencahayaan mempengaruhi perkembangan pertumbuhan secara *in vitro* maupun *in vivo*. Cahaya mampu mempengaruhi produksi metabolit suatu tanaman dalam kultur jaringan, baik metabolit primer maupun metabolit sekunder. Keberadaan cahaya juga menentukan proliferasi kalus (Khan *et al.*, 2018, Chen *et al.*, 2019).

## **1.2. Permasalahan**

Permasalahan yang akan dianalisis dalam penelitian ini adalah:

1. Bagaimana pengaruh zat pengatur tumbuh 2,4-D dan kinetin terhadap pertumbuhan dan produksi senyawa bioaktif flavonoid dan fenolik serta aktivitas antioksidannya pada kalus gembili?
2. Bagaimana pengaruh kondisi pencahayaan terhadap pertumbuhan dan produksi senyawa bioaktif flavonoid dan fenolik serta aktivitas antioksidannya pada kalus gembili?
3. Bagaimana kondisi pencahayaan dan konsentrasi 2,4-D dan kinetin yang optimal untuk pertumbuhan dan produksi senyawa bioaktif flavonoid dan fenolik serta aktivitas antioksidannya pada kalus gembili?

4. Apakah umur kalus berpengaruh terhadap pertumbuhan, kandungan flavonoid, fenolik dan aktivitas antioksidan?

### **1.3. Tujuan**

Tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Menganalisis pengaruh zat pengatur tumbuh 2,4-D dan kinetin terhadap pertumbuhan dan produksi senyawa bioaktif flavonoid dan fenolik serta aktivitas antioksidannya pada kalus gambeli.
2. Menganalisis pengaruh kondisi pencahayaan terhadap pertumbuhan dan produksi senyawa bioaktif flavonoid dan fenolik serta aktivitas antioksidannya pada kalus gambeli.
3. Menentukan konsentrasi 2,4-D dan kinetin serta kondisi pencahayaan yang paling optimal untuk pertumbuhan dan produksi senyawa bioaktif flavonoid dan fenolik serta aktivitas antioksidannya pada kalus gambeli.
4. Menentukan umur kalus yang tepat untuk dipanen.

### **1.4. Manfaat**

Manfaat dari penelitian ini adalah:

1. Diperoleh informasi komposisi ZPT dan kondisi pencahayaan yang paling optimal untuk pertumbuhan dan produksi senyawa bioaktif flavonoid dan fenolik pada kalus gambeli serta aktivitas antioksidannya.
2. Memberikan dasar teori bagi pengembangan produksi flavonoid dan fenolik dari kalus gambeli.
3. Meningkatkan nilai ekonomis gambeli sebagai bahan baku flavonoid dan fenolik

# BAB II

## TINJAUAN TEORI

### 2.1. Tanaman Gembili (*Dioscorea esculenta*)

#### 2.1.1. Klasifikasi

Klasifikasi dari tanaman gembili menurut Burkill (1917) adalah sebagai berikut:

Kingdom : Plantae  
Divisi : Magnoliophyta  
Ordo : Dioscorales  
Famili : Dioscoreaceae  
Genus : *Dioscorea*  
Spesies : *Dioscorea esculenta*

*Dioscorea esculenta* mempunyai nama daerah gembili, suda atau ubi aung.

#### 2.1.2. Morfologi

Gembili adalah tumbuhan umbi-umbian yang tumbuh merambat dengan batang yang dilengkapi duri dan daun berwarna hijau. Tumbuhan gembili mampu tumbuh hingga mencapai tinggi 3 meter. Bentuk batang *Dioscorea esculenta* bulat, dengan duri pada pangkal batang (dekat tanah). Batang berwarna hijau kecokelatan. Tipe daun tunggal dengan bentuk menjantung. Warna daun hijau kekuningan (Prabowo *et al.*, 2014). Morfologi batang dan daun gembili tersaji pada Gambar 1.



Gambar 2.1 Batang dan daun tumbuhan gembili  
(www.inaturalist.org)

Umbi gembili berbentuk oval sampai lonjong. Umumnya kulit umbi gembili memiliki akar (Fauziah & Mas'udah, 2015). Umbi gembili memiliki kulit tipis yang berwarna coklat dan umbi yang berwarna putih (Prabowo *et al.*, 2014). Umbi gembili dipanen pada tanah dengan kedalaman 5-25 cm. Petani melakukan budidaya umbi gembili sebagai bahan pangan dan juga bahan perdagangan. Umbi gembili mempunyai nilai ekonomis yang rendah, sehingga mulai jarang dibudidayakan oleh petani (Fauziah & Mas'udah, 2015). Gambar umbi gembili dapat dilihat pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2 Umbi Gembili (Retnowati et al., 2018).

Umbi gembili di daerah Papua memiliki bentuk, warna umbi, warna kulit dan permukaan kulit yang bervariasi (Gambar 2.3). Berbagai bentuk gembili di Papua dilaporkan oleh Sabda et al (2019). Dilaporkan bahwa terdapat 8 aksesori gembili yang memiliki morfologi bervariasi.





Gambar 2.3 Morfologi umbi delapan aksesori gembili Papua (Sabda et al., 2019)

### 2.1.3. Biokimia

Masyarakat pedesaan menggunakan umbi gembili sebagai bahan pangan alternatif, karena umbi gembili mengandung karbohidrat yang tinggi (Sabda *et al.*, 2019). Komposisi gizi umbi gembili tersaji pada Tabel 1. Kandungan tertinggi yang diperoleh pada umbi gembili adalah karbohidrat (Wibawa *et al.*, 2011).

Tabel 2.1 Hasil Analisis Komposisi Zat Gizi Gembili Mentah, Rebus, Kukus, dan Goreng

Analisis Komposisi Zat Gizi	Gembili Mentah	Gembili Rebus	Gembili Kukus	Gembili Goreng
Kadar Air (%)	64.49	68.09	62.11	49.09
Kadar Abu (%bk)	1.62	2.15	2.13	2.56
Kadar Lemak (%bk)	0.51	0.63	0.37	7.75
Kadar Protein (%bk)	4.63	3.71	2.99	4.25
Carbohydrate by difference (%bk)	85.87	91.05	93.33	88.88
Tingkat Gelatinisasi (%bk)	60.39	60.66	84.21	51.58
Total Pati (%bk)	-	44.64	62.12	47.94
Kadar Amilosa (%bk)	-	1.55	1.77	0.68
Kadar Amilopektin (%bk)	-	43.08	60.36	47.26
Kadar Serat (%bk):				
IDF	18.43	13.17	11.79	13.43
SDF	5.77	5.84	6.37	10.88
TF	24.02	19.01	18.15	24.30

Rimbawan & Nurbayani, 2013

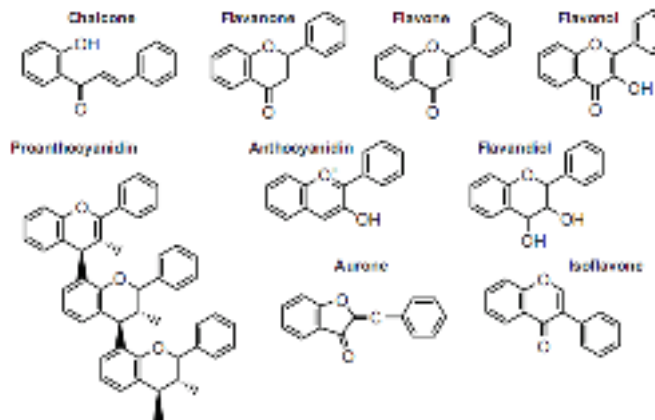
Shajeela *et al.* (2011) melaporkan bahwa gembili merupakan sumber yang baik dari protein, lipid, serat kasar, tepung, vitamin dan mineral. Inulin merupakan serta fiber yang diperlukan untuk memelihara kesehatan. Yuniastuti & Iswari (2019) melaporkan kemurnian inulin yang diisolasi dari gembili adalah 73.585%. Di antara genus *Dioscorea* spp., gembili merupakan salah satu spesies yang mengandung inulin dengan jumlah paling tinggi (Nuryana, 2018). Gembili mengandung polisakarida larut air (PLA). Pengurangan kadar protein PLA umbi gembili sebesar 49,6 % dapat terjadi pada proses deproteinasi menggunakan protease *Aspergillus oryzae* 0,05%. PLAd memiliki potensi sebagai hipolipidemik lebih tinggi dibandingkan dengan PLAc dan kontrol. Pemberian PLAd umbi gembili selama pengujian pada tikus hiperlipidemia dapat peningkatan kolesterol HDL(46,95%) dan menurunkan trigliserida (40,8%), kolesterol LDL (92,98%), dan kolesterol total (52,92%). Proses fermentasi PLA umbi gembili didalam caecum tikus akan menghasilkan *short chain fatty acid* (SCFA) berupa asam asetat, propionat dan butirrat (Herlina *et al.*, 2013). Khasanah *et al* (2019) melaporkan hasil analisis oligosakarida dan monosakarida dari gembili menunjukkan bahwa oligosakarida pada gembili mengandung latulosa, inulin dan rafinosa. Oligosakarida ini meningkatkan probiotik dan mengurangi bakteri patogen. Hal ini menunjukkan bahwa oligosakarida dari gembili potensial sebagai prebiotik (Khasanah *et al.*, 2019).

Anggota genus *Disocorea* dilaporkan mengandung metabolit sekunder saponin, alkaloid, flavonoid, tannin, dan fenol. Selain itu juga mengandung asam askorbat, niasin, riboflavin dan tiamin. Tuber genus ini juga dilaporkan mengandung kalsium, magnesium, fosfor, potasium dan sodium. Flavonoid mempunyai aktivitas sebagai antioksidan. Kandungan fenol pada genus *Disocorea* mengindikasikan bahwa genus ini mempunyai aktivitas antiinflamasi, antioksidan, meningkatkan imunitas dan juga sebagai modulator hormon (Okwu & Ndu 2006). Lebih lanjut Okwu & Ndu (2006) melaporkan bahwa pada genus *Dioscorea* mengandung diosgenin yang dapat digunakan sebagai prekursor untuk sintesis hormon dan kortikosteroid yang membantu fertilitas pada laki-laki. Umbi gembili juga dilaporkan mengandung senyawa bioaktif berupa dioscorin dan diosgenin yang berperan sebagai *immunomodulator*, mencegah penyakit

metabolik, mencegah inflamasi dan kanker (Prabowo *et al.*, 2014). Hasil penelitian menunjukkan bahwa umbi dan daun gembili mengandung 15 macam saponin (Lee *et al.*, 2017). *Dioscorea esculenta* juga mengandung senyawa confusarin dan nudol. Confusarin and nudol mempunyai aktivitas antioksidan (Aminah *et al.*, 2017). Selain itu juga gembili mengandung fenolik, tannin, hidrogen peroksida, oksalat, amilase dan tripsin inhibitor (Shajeela *et al.*, 2011). Kandungan senyawa bioaktif pada gembili yang dilaporkan oleh Senanayake *et al.*, (2011) antara lain saponin, flavonoid dan alkaloid.

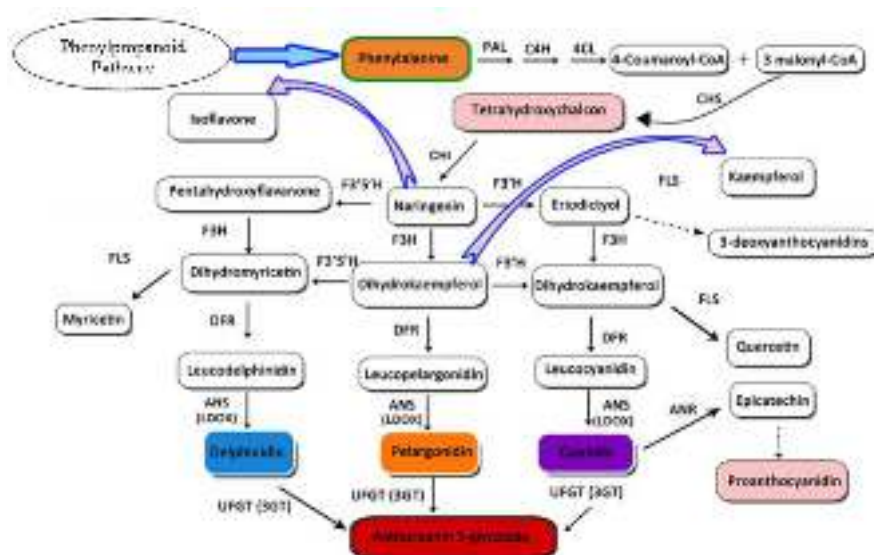
## 2.2. Flavonoid dan Fenolik

Flavonoid pada tumbuhan antara lain berperan sebagai molekul *signaling* dalam respons tumbuhan terhadap isyarat lingkungan terutama selama stres biotik dan abiotik, serta *signaling* interaksi tumbuhan dengan mikroba. Fungsi flavonoid lainnya adalah menjaga integritas struktur tumbuhan, fotoproteksi UV, reproduksi, dan pengaturan internal fisiologi (Ferreya *et al.*, 2012, Petrusa *et al.*, 2013). Flavonoid mengandung molekul aromatik yang berasal dari Phenilalanin dan malonyl-coenzymeA (CoA melalui jalur asam lemak). Jalur biosintesis flavonoid dimulai dari metabolisme phenylpropanoid umum dan membentuk berbagai kelompok flavonoid (Gambar 2.4) (Ferreya *et al.*, 2012).



Gambar 2.4 Struktur kelas utama flavonoid  
(Ferreya *et al.*, 2012)

Jalur utama biosintesis flavonoid pada tanaman dengan berbagai enzim kunci yang terlibat secara lebih lengkap dapat dilihat pada Gambar 2.5.



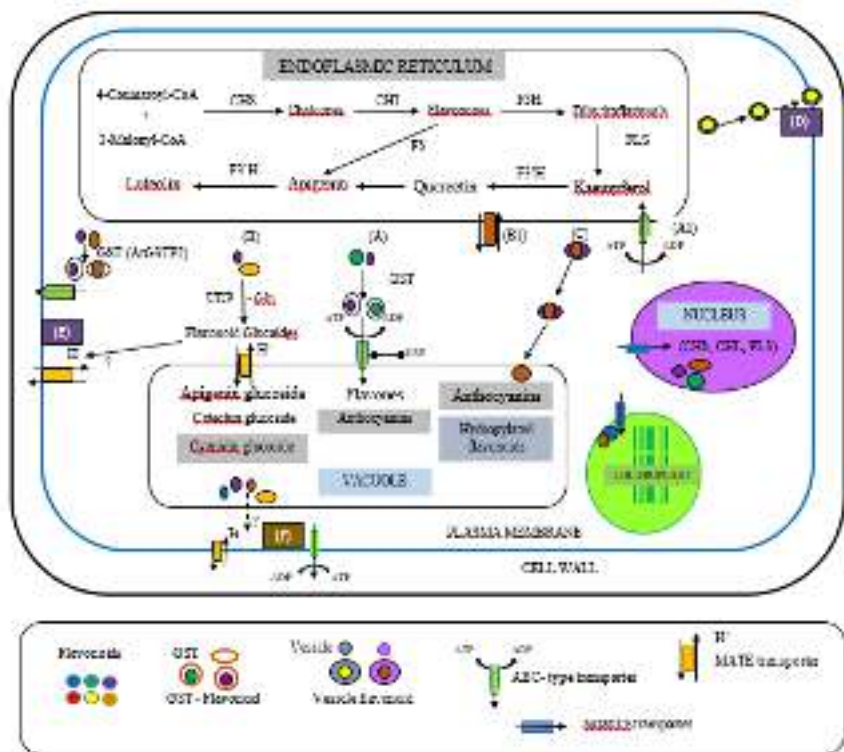
Gambar 2.5. Jalur utama biosintesis flavonoid pada tanaman (Liu *et al.*, 2013).

Sintesis flavonoid *organ- and tissue-dependent*, dan dipengaruhi oleh kondisi lingkungan seperti intensitas cahaya, temperatur, dan nitrogen. Meskipun biosintesis flavonoid pada tanaman mengikuti jalur yang sama tetapi jenis dan konsentrasi flavonoid yang dihasilkan berbeda pada tiap spesies. Hal ini terjadi karena pola ekspresi gen yang berkaitan dengan enzim kunci maupun faktor transkripsi yang terlibat dalam biosintesis flavonoid bervariasi tergantung pada tahap perkembangan organ, respons perlakuan hormonal dan respons terhadap stimulasi luka (Zhao *et al.*, 2013).

Di *Arabidopsis*, sitokinin merupakan regulator positif untuk jalur biosintesis antosianin dan berfungsi dengan cara mengatur ekspresi gen *PAL1*, *CHI*, *CHS* and *DFR* pada biosintesis antosianin. Dua gen diatur oleh sitokinin pada tahap transkripsi dan dua gen diatur pada tahap post

transkripsi. Sitokinin secara signifikan menekan beberapa *transporter* makronutrien seperti nitrat, ammonium, sulfat dan fosfat di mana nitrat merupakan pengatur ekspresi gen yang terlibat dalam jalur metabolit sekunder seperti jalur shikimat, fenilpropanoid dan flavonoid. Represi nitrat menyebabkan ekspresi atau pengaturan lebih lanjut gen yang terlibat dalam jalur biosintesis metabolit sekunder.

Pembentukan flavonoid terutama terjadi di retikulum endoplasma (RE) (Gambar 2.6). Flavonoid yang dihasilkan RE kemudian di kirim ke vakuola dan juga membran sel. Flavonoid menembus membran tonoplast melalui *ATP binding cassette (ABC)-type* dan *multidrug and toxic ions extrusion (MATE) transporters*.



Gambar 2.6 Mekanisme transpor flavonoid di dalam sel tumbuhan (Agati *et al.*, 2012)

Senyawa fenolik merupakan kelompok besar dari metabolit sekunder yang memiliki struktur yang sangat bervariasi dari yang sederhana seperti asam fenolik sampai polifenol seperti flavonoid, yang terdiri atas beberapa grup sampai senyawa polimerik. Polifenol mempunyai aktivitas sebagai antioksidan (Cheynier, 2012). Beberapa senyawa fenolik tersebar luas sedangkan beberapa spesifik hanya pada famili tumbuhan tertentu atau hanya pada organ atau tahap perkembangan tumbuhan tertentu. Struktur yang beranekaragam berkaitan dengan berbagai sifat dan peran dari senyawa tersebut, dan juga distribusi spesifik pada tumbuhan. Misalnya antosianin merupakan pigmen dari organ tumbuhan berwarna merah dan biru. Senyawa tersebut terdapat pada bunga dan buah yang matang dan memegang peranan sebagai antraktan untuk proses polinasi dan diseminasi biji. Senyawa fenolik dilaporkan mempunyai berbagai efek biologis termasuk antikanker, antivirus, antioksidan dan antiinflamasi. Asam fenolik juga dilaporkan menghambat kanker kolon (Rosa *et al.*, 2016).

### **2.3. Antioksidan**

Antioksidan berdasarkan arti katanya berarti antioksidasi, lebih jauh, antioksidan berfungsi sebagai donor elektron bagi senyawa yang bersifat radikal maupun senyawa yang tergolong kedalam *Reactive Oxygen Species* (ROS). Sumber antioksidan alami terdapat pada bagian daun, batang, bunga dan akar tanaman serta bagian umbi tanaman. Antioksidan mempunyai sifat yang berbeda, tergantung sumber dan jenis antioksidan pada tanaman tersebut (Anggraini, 2017).

Senyawa fenolik mempunyai berbagai efek biologis seperti aktivitas antioksidan melalui mekanisme sebagai pereduksi, penangkap radikal bebas, pengkhelat logam, peredam terbentuknya singlet oksigen serta pendonor elektron. Nilai total polifenol mempunyai korelasi positif dengan nilai aktivitas antioksidan (Anggraini, 2017). Flavonoid memberikan kontribusi pada aktivitas antioksidannya secara *in vitro* dengan cara flavonoid mengikat (kelasi) ion-ion metal seperti Fe dan Cu. Ion-ion metal seperti Cu dan Fe ini, dapat mengkatalisis reaksi yang akhirnya memproduksi radikal bebas (Muchtadi 2012).

## **2.4. Kultur Jaringan Sebagai Metode Produksi Metabolit Sekunder**

### **2.4.1. Faktor yang Mempengaruhi Produksi Metabolit Sekunder Melalui Kultur Jaringan**

Produksi metabolit sekunder melalui kultur jaringan dipengaruhi antara lain oleh komposisi medium, hormon atau ZPT dan pencahayaan. Penggunaan medium Murashige & Skoog (MS) dalam kultur suku *Dioscorea* telah banyak dilaporkan. Kultur sel tanaman *Dioscorea deltoidea* untuk produksi metabolit sekunder menggunakan medium MS (Vanisree *et al.* (2007). Media MS juga digunakan sebagai media propagasi *in vitro* *Dioscorea alata* untuk produksi tirosinase (Samy *et al.*, 2017). Induksi kalus uwi ungu *Dioscorea alata* L. dilakukan dalam media MS (Rudiyanto *et al.*, (2019).

Hormon merupakan kurir kimiawi yang dihasilkan pada satu sel dan mengatur proses selular dalam sel lain dengan cara berinteraksi dengan protein spesifik yang berfungsi sebagai reseptor yang berhubungan dengan jalur transduksi seluler (Taiz & Zeiger, 2010). Hormon umumnya aktif dalam jumlah kecil dan mempengaruhi proses fisiologi tumbuhan. Proses yang dipengaruhi antara lain adalah pertumbuhan, diferensiasi, perkembangan, dan berbagai proses lainnya. Perkembangan tumbuhan diatur oleh bermacam-macam hormon di antaranya auksin, sitokinin, giberelin, etilen, asam absisat dan brassinosteroid. Auksin dan sitokinin diperlukan oleh tumbuhan pada hampir semua proses perkembangan secara kontinyu, berbeda dengan hormon yang lain yang hanya diperlukan pada tahapan tertentu saja (Taiz & Zeiger, 2010).

Auksin di dalam tumbuhan antara lain berperan menginduksi pembesaran sel, pembelahan sel, diferensiasi jaringan vaskular, inisiasi akar, dominansi apikal, dan menghambat senescen daun. Auksin berpindah dari satu sel ke sel lain melalui 2 mekanisme yaitu transpor polar dan transpor melalui floem. Di pucuk dan daun, auksin berpindah secara basipetal, dari apeks ke basal tumbuhan. Perpindahan serupa juga terjadi pada urat daun. Sedangkan di akar, auksin berpindah secara akropetal menuju apeks akar. Laju perpindahan auksin 10-11 mm/jam tanpa memperhatikan apakah jaringan tersebut dalam posisi vertikal, horizontal ataupun bolak-balik. Auksin ditranspor secara langsung melalui jaringan

parenkim, dari satu sel ke sel berikutnya dengan satu arah (*transport polar*) (Campbell & Reece, 2009).

Pusat sintesis auksin yang paling aktif adalah meristem apikal pucuk, daun muda, bunga, buah dan biji. Pada primordia daun Arabidopsis yang sangat muda, auksin disintesis pada ujung daun. Selama perkembangan daun terjadi perpindahan secara perlahan tempat produksi auksin secara basipetal sepanjang margin, dan kemudian di daerah pusat lamina. Perpindahan basipetal dalam produksi auksin sangat berkaitan dengan rangkaian maturasi basipetal pada perkembangan daun dan diferensiasi vaskular (Aloni, 2001).

Konsentrasi hormon dapat dikontrol tidak hanya dari sintesisnya saja tetapi juga oleh destruksi dan konversinya. Enzim yang mengonversi tritofan menjadi IAA terbentuk di seluruh bagian tanaman dan hanya aktif di daerah dengan aktivitas metabolik yang sangat tinggi seperti meristem, daun yang berkembang, buah dan ujung akar. Auksin alami yang ditemukan di semua tumbuhan adalah *Indole-3-acetic acid* (IAA). *Indole-3-acetic acid* (IAA) merupakan auksin utama di sebagian besar tumbuhan. Pada tumbuhan tertentu, ditemukan struktur auksin alami lainnya antara lain *4-Chloroindole-3 acetic acid* (4-Cl-IAA) yang terdapat pada kacang polong dan *Indole-3butyric acid* (IBA) yang terdapat pada jagung (Taiz & Zeiger, 2010).

Antioksidan mempunyai arti antioksidasi. Antioksidan mempunyai fungsi sebagai pendonor elektron bagi senyawa yang bersifat radikal dan juga senyawa yang termasuk dalam golongan *Reactive Oxygen Species* (ROS). Bagian daun, batang, akar dan bunga tanaman serta bagian umbi tanaman merupakan sumber antioksidan alami. Sifat antioksidan berbeda-beda, tergantung pada jenis dan sumber antioksidan pada tanaman tersebut (Anggraini, 2017). Pada sel di daerah elongasi, auksin akan terikat pada reseptor yang terdapat pada dinding sel. Ikatan auksin dan reseptor akan menyebabkan terjadinya pemompaan proton pada membran plasma. Menurut hipotesis pertumbuhan asam, pompa proton memegang peranan penting dalam respons pertumbuhan sel karena adanya auksin. Pemompaan proton meningkatkan potensial membran dan menyebabkan terjadinya pH yang lebih rendah di dalam dinding sel dalam beberapa menit. Asidifikasi pada dinding sel akan mengaktifkan enzim yang disebut

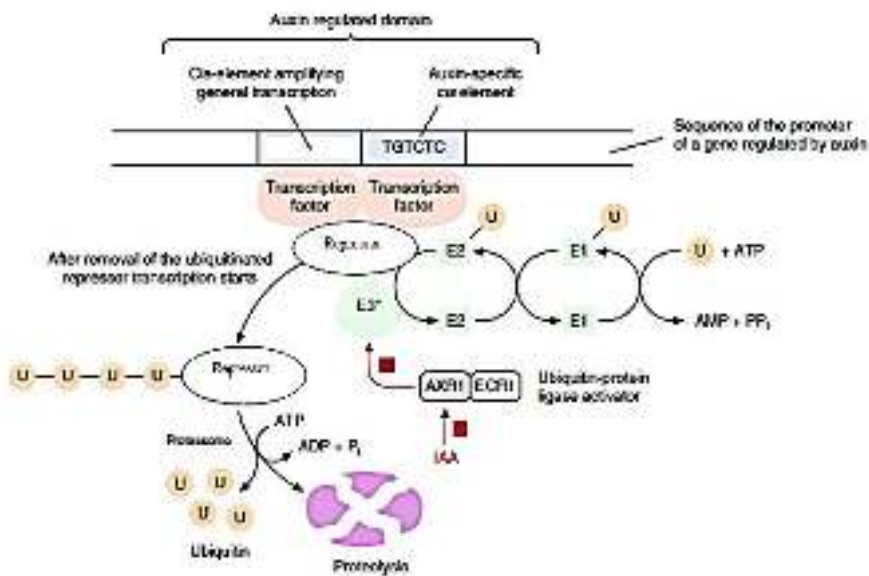


ekspansin yang akan memecah ikatan hidrogen antara mikrofibril selulosa dan bahan penyusun dinding lainnya, yang menyebabkan longgarnya struktur dinding. Meningkatnya potensial membran meningkatkan pengambilan ion ke dalam sel, yang menyebabkan pengambilan air secara osmotik dan meningkatkan turgor. Meningkatnya turgor dan plastisitas dinding sel memungkinkan sel untuk memanjang (Campbell & Reece, 2009).

Senyawa fenolik memiliki berbagai efek biologis antara lain aktivitas antioksidan. Senyawa ini dapat berfungsi sebagai pereduksi, pengkhelat logam, peredam terbentuknya singlet oksigen, penangkap radikal bebas, serta pendonor elektron. Nilai polifenol berkorelasi positif dengan nilai aktivitas antioksidan (Anggraini, 2017). Aktivitas antioksidan Flavonoid secara *in vitro* dilakukan dengan cara pengikatan (kelasi) ion-ion metal seperti Fe dan Cu. Ion-ion metal seperti Cu dan Fe mempunyai kemampuan mengkatalisis reaksi yang memproduksi radikal bebas (Muchtadi 2012). Di kultur sel, auksin yang ditambahkan ke dalam medium (IAA atau auksin sintetik yang lebih stabil) secara cepat berkonjugasi dengan gula. Kemungkinan IAA dalam bentuk penyimpanan seperti itu, merupakan persediaan jangka lama bagi jaringan. Proses konjugasi yang memodifikasi cincin indol atau rantai samping auksin menyebabkan hilangnya aktivitas biologis auksin. Pemecahan IAA terjadi melalui proses oksidatif, tergantung pada spesies tanaman, beberapa reaksi dapat berbeda. Jalur utama yaitu katabolisme menjadi *3-methylene-2-oxindole* dan *3-methyl-2-oxindole*, dan menjadi *indole-3-carbonic acid*. Reaksi ini dikatalisis oleh enzim *peroksidase* (IAA *oksidase*) (Sonnewald, 2013).

Proses fisiologi melibatkan ekspresi gen; gen yang diatur secara langsung berbeda dengan gen yang diatur secara tidak langsung. Pengaturan gen yang kedua kemungkinan dikontrol oleh produk gen dari gen utama yang langsung diatur oleh auksin, sebagian berupa faktor transkripsi. Pada promotor gen primer yang diatur oleh auksin, terdapat bagian yang berikatan dengan auksin. IAA mengaktifkan kompleks heterodimeric dari protein AXR1 and ECR1, yang berlokasi di dalam nukleus dan mengaktifkan ubiquitin–protein ligase (E3\*) (Gambar 2.7). Hal ini mendorong proses *ubiquitination* dari protein represor spesifik.

Protein represor ini merupakan protein yang mencegah transkripsi gen yang diatur oleh auksin. Protein represor terikat pada faktor transkripsi gen-gen yang diatur oleh auksin. Dalam proses *ubiquitination*, protein diaktivasi dengan pelekatan molekul kecil ubiquitin. Proses *ubiquitination* dari protein represor ini menginduksi pemecahan represor oleh proteosom. Hilangnya represor menyebabkan transkripsi dari gen-gen tersebut (Sonnewald, 2013).

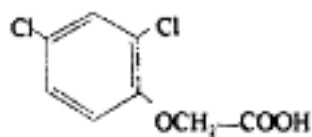


Gambar 2.7 Model hipotesis aktivasi gen oleh IAA (Sonnewald, 2013)

Sitokinin merupakan hormon yang memacu pembelahan sel atau sitokinesis dan mempengaruhi jalur diferensiasi. Sitokinin yang umum dihasilkan tumbuhan adalah zeatin. Sitokinin mencapai jaringan target melalui xilem. Rasio sitokinin terhadap auksin mengontrol diferensiasi. Ketika konsentrasi hormon pada tingkatan tertentu, massa sel akan terus tumbuh, tetapi tetap sebagai sel yang tidak terdiferensiasi (kalus). Jika sitokinin meningkat, tunas akan berkembang dari kalus. Jika auksin yang meningkat, akar yang terbentuk (Campbell & Reece, 2009).

Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) adalah zat bukan hara alami ataupun sintetik yang dalam konsentrasi rendah mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan bagian tanaman atau tanaman secara utuh, baik *ex vitro* maupun *in vitro* (Hapsoro & Yunita, 2018). Zat pengatur tumbuh sangat diperlukan sebagai komponen medium bagi pertumbuhan dan diferensiasi sel. Tanpa penambahan zat pengatur tumbuh, dalam medium pertumbuhan sangat terhambat bahkan mungkin tidak dapat tumbuh sama sekali. Setiap eksplan yang berasal dari organ dan spesies yang berbeda akan membutuhkan zat pengatur tumbuh yang berbeda pula (Veraplakorn, 2016, Sing *et al.*, 2014, Habibah *et al.*, 2016, Habibah *et al.*, 2018, Habibah *et al.*, 2019, Habibah *et al.*, 2020). Rasio sitokinin dan auksin akan menentukan arah pertumbuhan kultur *in vitro* (Hapsoro & Yusnita, 2018). Arah perkembangan kultur ditentukan oleh adanya interaksi dan perimbangan zat pengatur tumbuh yang diproduksi oleh tanaman secara endogen. Walaupun pada eksplan sudah terdapat zat pengatur tumbuh secara endogen, tetapi pada kenyataannya sering kali tetap ditambahkan zat pengatur tumbuh secara eksogen pada medium untuk memacu pertumbuhan dan perkembangan eksplan yang ditanam secara *in vitro*.

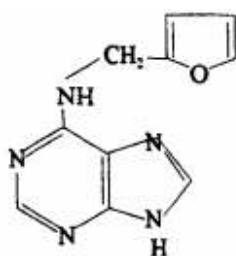
Golongan auksin sintetik yang sering digunakan adalah: 2,4 Diklorofenoksi Acetic (2,4-D), NAA (*Naphtalene Acetic Acid*) dan IBA (*Indol 3-Butiric Acid*). Golongan sitokinin yang sering ditambahkan adalah kinetin, zeatin dan Benzil Amino Purin (BAP). Kinetin dan BAP bersifat tahan terhadap degradasi dan harganya lebih murah. Secara umum, konsentrasi sitokinin yang digunakan berkisar antara 0,1-10mg/l. Zat pengatur tumbuh 2,4-D sering digunakan dalam induksi kalus. Penambahan 2,4-D untuk induksi kalus *Calotropis gigantea* memberikan hasil terbaik dibandingkan dengan NAA dan IAA (Tripathi *et al.*, 2012). Induksi kalus *chrysanthemum* terbaik diperoleh dari kombinasi 2,4-D dan kinetin (Setiawati *et al.*, 2020). Penambahan 2,4-D ke dalam medium kultur mampu mempercepat proses pembelahan sel serta pembesaran sel pada eksplan tanaman yang dikultur sehingga pembentukan dan pertumbuhan kalus mengalami peningkatan. Struktur 2,4-D dapat dilihat pada Gambar 2.8.



### 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)

Gambar 2.8 Struktur kimia zat pengatur tumbuh 2,4-D  
(Gaspar *et al.*, 1996).

Kinetin merupakan golongan sitokinin yang sering digunakan. Rumus bangun Kinetin dapat dilihat pada Gambar 2.9. Sitokinin dibutuhkan untuk perkembangan siklus sel pada fase G1/S, G2/M atau S. Peran cytokinin pada awal G1 dan di fase S tidak sepenuhnya dipahami, tetapi masing-masing dapat terlibat dalam keluar dari siklus sel dan Transisi S /G2 dengan cara yang belum jelas. Sitokinin mengatur pembelahan sel pada tiga tahapan. Inisiasi dan penghentian siklus sel diatur oleh banyak sitokinin yang berasal dari luar siklus sel. Transisi G2/M tampaknya berada di bawah kontrol satu sitokinin tertentu, yang diproduksi oleh siklus sel itu sendiri (Roef & Onckelen, 2007).



### Kinetin 6-furfurylamino-purine

Gambar 2.9 Struktur kimia zat pengatur tumbuh kinetin  
(Gaspar *et al.*, 1996).

Penggunaan kombinasi 2,4-D dan kinetin untuk induksi kalus dilaporkan pada *Aquilaria malaccensis*. Kombinasi,4-D dan kinetin untuk

induksi kalus *Aquilaria malaccensis* menghasilkan kalus dengan persentase pembentukan kalus yang tinggi, kalus yang tumbuh dengan cepat, sehat dan viable (Saikia *et al.*, 2013). Kultur kalus dengan pertumbuhan terbaik dari eksplan nodus *Cassia occidentalis* dihasilkan pada medium MS dengan penambahan 2, 4-D (5 mg/l) and Kinetin (0.02 mg/l) (Vats & Kamal, 2014).

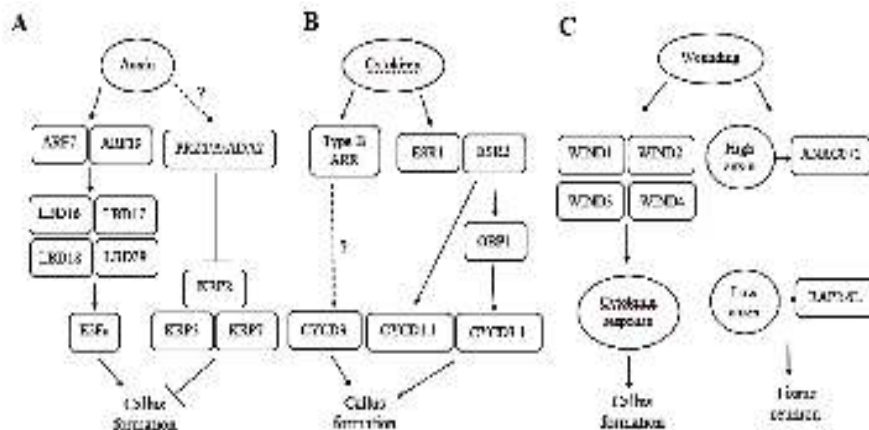
Kondisi pencahayaan mempengaruhi pertumbuhan kultur dan produksi metabolit sekunder. Pencahayaan mempengaruhi perkembangan pertumbuhan secara *in vitro* maupun *in vivo*. Berdasarkan penelitian yang telah dilaporkan oleh Khan *et al.* (2018) dan Chen *et al.* (2019), cahaya mampu mempengaruhi produksi metabolit suatu tanaman dalam kultur jaringan, baik metabolit primer maupun metabolit sekunder. Keberadaan cahaya juga menentukan proliferasi kalus.

#### **2.4.2. Produksi Metabolit Sekunder pada Kalus**

Kultur kalus dapat diartikan sebagai kultur massa sel yang tidak terdiferensiasi sebagai hasil penanaman suatu potongan jaringan secara *in vitro*. Kalus dapat pula diartikan sebagai jaringan parenkim yang dilukai yang mampu berproliferasi secara *in vitro* pada kondisi aseptik. Sesuai dengan teori totipotensi sel, setiap bagian tumbuhan dapat digunakan sebagai sumber eksplan dalam inisiasi kalus. Pada umumnya jaringan muda mempunyai kondisi biologis yang sesuai dan baik untuk inisiasi kalus. Kalus yang terbentuk merupakan hasil proliferasi sel untuk menutup luka, oleh karena itu kalus biasanya terbentuk pada luka bekas irisan. Kalus dapat dihasilkan dari semua bagian tanaman seperti biji, batang, akar, daun, organ penyimpan cadangan atau buah, tetapi organ yang berbeda menunjukkan kecepatan pembelahan yang berbeda. Meskipun semua jenis sel pada prinsipnya dapat ditumbuhkan, tetapi bagian tanaman yang masih muda dan mudah tumbuh yaitu bagian meristem, misal daun muda, ujung batang, ujung akar dan sebagainya merupakan bagian yang paling baik untuk dijadikan eksplan.

Aktivasi pengatur siklus sel pusat seperti CYCLIN (CYCs) atau CYCLIN-DEPENDENT KINASES (CDKs) saja tidak cukup menginduksi kalus. Sebagian proses induksi kalus menggambarkan adanya peran pengatur transkripsional atau post transkripsional yang menyebabkan

perubahan global dalam ekspresi gen dan translasi protein (Ikeuchi *et al.*, 2013). Proses induksi kalus oleh auksin, sitokinin dan adanya luka terlihat pada Gambar 2.10.

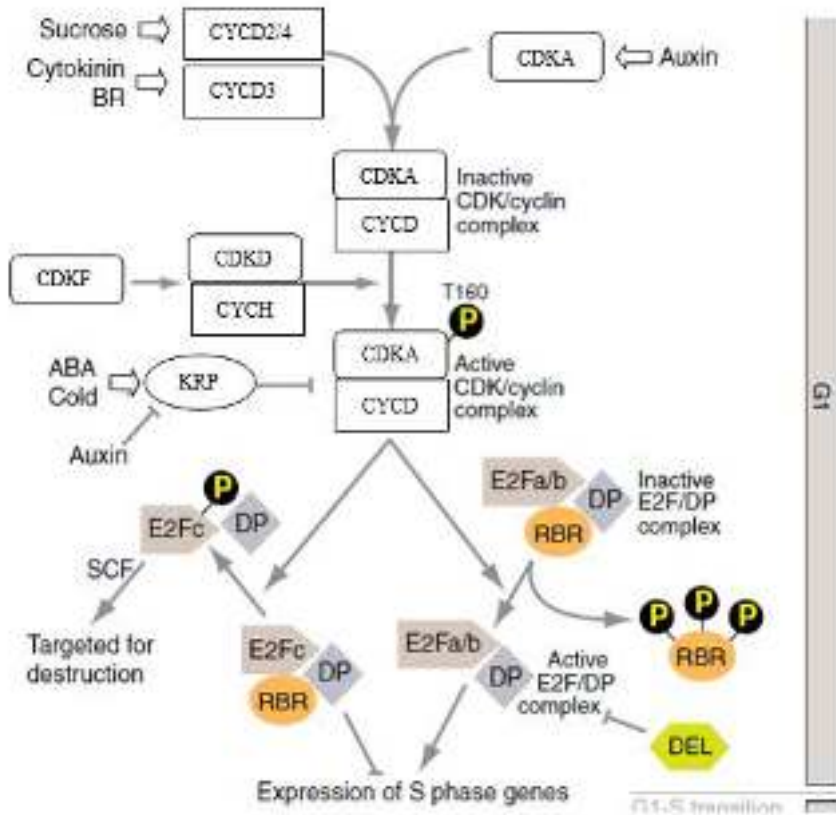


Gambar 2.10 Mekanisme pembentukan kalus (Ikeuchi *et al.*, 2013)

Pada pembentukan kalus yang diinduksi auksin, sinyal auksin ditransduksi melalui faktor transkripsi AUXIN RESPONSE FACTOR (ARF) terutama ARF7 dan ARF19, untuk mengaktifkan ekspresi dari faktor transkripsi LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN (LBD). LBD menginduksi E2 PROMOTER BINDING FACTOR a (E2Fa), E2Fa kemudian membentuk dimerisasi dengan protein DIMERIZATION PARTNER (DP), dan mendorong transkripsi gen-gen yang diperlukan untuk replikasi DNA. Sitokinin juga berperan dalam induksi kalus. Sinyal sitokinin ditransduksi melalui 2 komponen jalur mengatur untuk mengaktifkan faktor transkripsi type-B ARR. Ekspresi dari *CYCD3*; sangat diatur oleh sitokinin. Faktor transkripsi AP2/ERF dari ESR1 juga atur oleh sitokinin. ESR1 dan ESR2 mendorong reaktivasi siklus sel karena ESR2 menginduksi ekspresi gen *CYCD1*. ESR2 juga menginduksi OBP1. OBP1 mendorong aktivasi siklus sel dengan menginduksi ekspresi gen *CYCD3* dan beberapa pengatur siklus sel lainnya (Ikeuchi *et al.*, 2013).

Pembentukan kalus selain diinduksi oleh auksin dan sitokinin, dapat juga terjadi karena adanya luka. Pemotongan keseluruhan hipokotil pada *Arabidopsis* menginduksi ekspresi dari gen-gen *WIND* pada tempat terjadinya luka, yang kemudian menginduksi respons sitokinin untuk menginduksi pembentukan kalus. Ketika batang dipotong sebagian, auksin ditranspor dari apeks pucuk dan terakumulasi pada bagian yang terluka, yang kemudian menginduksi ekspresi gen *ANAC071*. Auksin juga menginduksi gen *RAP2*. Kedua respons tersebut diperlukan untuk aktivasi lokal proliferasi sel untuk menutup luka (Ikeuchi *et al.*, 2013).

Hormon tumbuhan mempunyai peranan penting dalam mengontrol siklus sel karena hormon dapat secara langsung mengatur enzim kunci dalam siklus sel (Pereira *et al.*, 2012). Pada siklus sel, faktor pertumbuhan (sukrosa, auksin, dan sitokinin) mendorong D-TYPE CYCLINS (CYCD) berasosiasi dengan A-TYPE CDK (CDKA), membentuk kompleks CDKA/CYCD inaktif (Gambar 2.11). Kompleks ini diaktifkan melalui fosforilasi oleh *CDK-activating kinase pathway*. Kompleks CDKA/CYCD aktif menggerakkan transisi G1 ke S. Di lain pihak, fosforilasi CDKA/CYCD akan menginisiasi kerusakan kompleks represor transkripsional E2Fc/DP/RBR oleh SCF E3-UBIQUITIN-PROTEIN LIGASE. Fosforilasi RBR akan melepaskan aktivitas transkripsional kompleks E2Fa-b/DP/RBR. Sebagai hasilnya, gen-gen fase S menjadi aktif (Inz'e dan Veylder, 2006). Auksin dan sitokinin juga mempunyai peranan penting dalam transisi dari fase G2 ke M karena hormon ini mengaktifkan CDC25-like phosphatase yang terlibat dalam transisi siklus sel (Pereira *et al.*, 2012). Aktifnya gen pada fase S akan mendorong sel untuk melakukan pembelahan. Pembelahan yang terus menerus mendorong terbentuknya kalus.



Gambar 2.11 Induksi pembelahan oleh auksin dan sitokinin (Inz'e & Veylder, 2006)

Pembentukan kalus sangat dipengaruhi oleh zat pengatur tumbuh. Efisiensi auksin dan sitokinin dalam induksi kalus tergantung pada umur sumber eksplan, dan tipe organ yang digunakan sebagai eksplan. Jaringan yang berbeda mempunyai sensitivitas berbeda terhadap fitohormon, bahkan dalam spesies yang sama. Yücesan *et al.* (2014) melaporkan bahwa kalus *Ivanina* terbentuk pada medium yang diberi tambahan BA dan NAA. Induksi kalus pada *Gardenia resinifera* dengan eksplan potongan biji dilaporkan terbentuk pada medium dengan penambahan 2,4-D dan BAP, sedangkan pada eksplan internodus membutuhkan NAA dan BAP (Lakshmi & Reddy, 2012). Penggunaan 2,4-D dan picloram dilaporkan



pada induksi kalus *Rollinia mucosa* (Figueiredo, *et al.*, 2000). Tanpa tambahan zat pengatur tumbuh, eksplan tidak dapat tumbuh dan akhirnya mati.

Sintesis senyawa bioaktif pada kultur sel sangat bervariasi pada tiap spesies. Sebagian kultur sel dapat menghasilkan senyawa bioaktif tetapi sebagian tidak. Sebagian kultur sel dapat menghasilkan metabolit sekunder lebih banyak daripada tumbuhan utuh tetapi ada pula yang sebaliknya. Produksi metabolit sekunder pada kultur *in vitro* dipengaruhi oleh beberapa hal antara lain konsentrasi zat pengatur tumbuh eksogen (Amoo & Staden, 2012, Amoo *et al.*, 2012, Gurel *et al.*, 2011), dan tahapan perkembangan jaringan (Keul *et al.*, 2012, Balasubramanya *et al.*, 2012, Misra & Dey, 2013).

Produksi metabolit sekunder dalam kalus sangat dipengaruhi oleh hormon. *Signal* hormon dapat mengatur proses fisiologis di dalam kultur tanaman (Molchan *et al.*, 2012). Zat pengatur tumbuh eksogen dapat mengubah akumulasi metabolit sekunder dengan mengatur ekspresi gen yang terlibat dalam sintesis metabolit sekunder. Pengaturan ekspresi gen dilakukan pada tahapan transkripsi dengan mengatur faktor transkripsi gen yang memegang peranan penting dalam proses perkembangan tanaman termasuk sintesis metabolit sekunder (Zhao *et al.*, 2011, Rosa *et al.*, 2013). Faktor transkripsi yang spesifik tanaman NAM/ATAF/CUC(NAC) memegang peranan kritis dalam berbagai proses perkembangan termasuk respons pertahanan. Faktor transkripsi domain NAC diduga diatur pada tingkat transkripsi oleh faktor lingkungan, seperti konsentrasi hormon. Induksi pada tingkat transkripsi PmNAC1 berkaitan dengan peningkatan konsentrasi auksin pada medium kultur (Rosa *et al.*, 2013). Auksin juga dilaporkan menginduksi gen pengkode enzim yang terlibat dalam jalur biosintesis flavonoid. Penambahan 1  $\mu$ m IAA menginduksi akumulasi mRNA *CHALCONE SYNTHASE (CHS)* dan *FLAVONOL SYNTHASE (FLS)* 3 kali lebih besar daripada kontrol (Lewis *et al.*, 2011).

Ikenaga *et al.* (2000) melaporkan bahwa produksi saponin dalam kultur kalus *Solanum aculeatissimum* dipengaruhi ZPT. Kalus memproduksi saponin 0,8% (per berat kering), atau 0,32% aculeatiside A dan 0,48% aculeatiside B pada penambahan 0,05 ppm atau 0,1 ppm NAA dan 10 ppm BA. Hormon tumbuhan juga secara signifikan mempengaruhi

akumulasi isoflavonoid dalam jaringan kalus kedelai. Penambahan NAA sebesar 5 mg/l meningkatkan produksi isoflavonoid hingga 1100 nmol/g berat basah (Downey *et al.*, 2013). Gurel *et al.* (2011) melaporkan bahwa komposisi hormon pada medium kultur berpengaruh pada produksi lanatoside C dan digoxin pada kultur *Digitalis davisiana*. Peningkatan metabolit sekunder akibat auksin dilaporkan juga pada kultur *Morus alba*. Pada kultur *Morus alba* penambahan IAA pada medium selain meningkatkan perkembangan kalus dan akar adventif juga meningkatkan kandungan rutin. Penambahan 5 mg/L IAA meningkatkan produksi rutin 87,5% selama 4 minggu pertama setelah kalus diinduksi (Lee *et al.*, 2011).

Metabolit sekunder pada tanaman secara normal disintesis oleh sel spesial, umumnya pada tahapan perkembangan tumbuhan yang berbeda. Senyawa tertentu tidak disintesis jika sel belum terdiferensiasi seperti pada suspensi sel. Pada beberapa tumbuhan, dilaporkan bahwa jaringan yang telah terdiferensiasi mengandung metabolit sekunder lebih banyak daripada jaringan yang belum terdiferensiasi. Aslam *et al.*, (2010) melaporkan bahwa pada kultur *Catharanthus roseus*, tahapan *germinating somatic embryos* merupakan tahapan yang mempunyai kandungan vinblastin paling tinggi dibandingkan pada kalus, embrio tahap proliferasi maupun maturasi. Pada Echinaceae, kandungan *cichoris acid* terdapat pada daun, tunas dan kalus, tetapi jumlahnya bervariasi tergantung pada tipe organ, dan yang tertinggi terdapat pada tunas dan daun (Keul *et al.*, 2012). Korelasi positif antara sintesis withanolide dan diferensiasi morfologi juga dilaporkan pada kultur *Withania coagulans*. Tunas *in vitro* mengandung metabolit sekunder lebih tinggi dari pada kalus. Hal ini menggambarkan bahwa sintesis metabolit sekunder diatur pada jalur yang spesifik pada organ tertentu dan organogenesis merupakan faktor pengatur kunci yang menstimulasi produksi metabolit sekunder secara *in vitro* (Jain *et al.*, 2011). Pada *Psoralea drupacea*, kultur suspensi sel tidak dapat menghasilkan bakuchiol. Bakuchiol dihasilkan oleh bagian aerial tanaman yang ditumbuhkan secara *in vitro* (Lystyan *et al.*, 2010). Flavonoid dihasilkan dalam konsentrasi yang lebih rendah pada kultur kalus *Heliotropium indicum* dibandingkan bagian tanaman *in vivo* (daun, batang dan bunga) (Kumar *et al.*, 2010). Biosintesis forskolin pada kultur *Plectranthus barbatus* dilaporkan *differentiation dependen* dan kultur

rhizogenik mengandung forskolin dalam jumlah paling tinggi (Balasubramanya *et al.*, 2012). Pada *Santalum album* dilaporkan bahwa kandungan terpenoid tertinggi terdapat pada ranting pohon tua yang 1,4 kali lebih tinggi dari pohon muda, 3,2 kali lebih tinggi dari bibit, 1,6 kali lebih tinggi dari embrio somatik dan 7,2 kali lebih tinggi daripada kalus (Misra & Dey, 2013). Kultur sel sambiloto menghasilkan andrografolid dengan jumlah yang jauh lebih kecil dari pada yang dihasilkan oleh tanaman sambiloto (Habibah, 2006). Diferensiasi jaringan penting untuk produksi metabolit sekunder. Jaringan yang berbeda tingkat diferensiasinya mempunyai sensitivitas yang berbeda terhadap kondisi lingkungan sehingga memberikan respons yang berbeda (Ptak *et al.*, 2010).

Pada beberapa tumbuhan, dilaporkan bahwa jaringan yang tidak terdiferensiasi dapat menghasilkan metabolit sekunder seperti jaringan yang telah terdiferensiasi. Senyawa naphthodianthrones dan phenyl propanoid dilaporkan dihasilkan oleh kultur kalus *Hypericum perforatum* L (Gadzovska *et al.*, 2012). Produksi allantoin, rabdosiin dan asam rosmarinik pada kultur kalus *Mertensia maritima* (Boraginaceae) juga telah dilaporkan (Fedoreyev *et al.*, 2012). Ram *et al.* (2013) melaporkan produksi antosianin pada kultur kalus *Rosa hybrida* L. Sintesis senyawa bioaktif pada kultur suspensi sel yang telah dilaporkan antara lain sintesis senyawa naphthodianthrones dan phenyl propanoid pada kultur kalus dan suspensi sel *Hypericum perforatum* L (Gadzovska *et al.*, 2012), Bonfill *et al.* (2011) pada kultur suspensi sel *Centella asiatica* dan andrografolid pada kultur sel sambiloto (Habibah, 2006).

Pada beberapa tumbuhan juga dilaporkan bahwa jaringan yang tidak terdiferensiasi mengandung metabolit sekunder lebih banyak daripada jaringan terdiferensiasi. Akumulasi alkaloid dalam kalus dan suspensi sel *Eurycoma longifolia* Jack dengan konsentrasi yang lebih tinggi dari tanaman utuh dilaporkan oleh Siregar *et al.*, (2006). Konsentrasi metabolit sekunder isoflavonoid yang lebih tinggi pada kultur sel dibanding pada tanaman juga dilaporkan pada kultur *Pueraria candollei* (Boonsnongcheep *et al.*, 2010). Produksi diosgenin pada kultur kalus *Helicteres isora* lebih tinggi dari pada biji dan daun yang berasal dari bibit *in vitro* (Kumar *et al.*, 2014).

Penelitian dengan teknik *in vitro* terhadap genus *Dioscorea* telah banyak dilakukan seperti pada *Dioscorea alata* (Shah & Lele, 2012; Fotso *et al.*, 2013), *Dioscorea oppositifolia* dan *Dioscorea pentaphylla* (Poornima & Ravishankar, 2007), *Dioscorea rotundata* (Manoharan *et al.*, 2016). Berdasarkan penelitian Samy *et al.* (2019), menunjukkan bahwa kalus yang berasal dari eksplan nodul batang *Dioscorea alata* yang dikultur dengan penambahan ZPT berupa 2,4-D dengan konsentrasi 1 mg/L menunjukkan perkembangan kalus yang paling optimal. Manoharan *et al.* (2016) menyatakan bahwa eksplan nodul *Dioscorea rotundata* pada media MS yang mengandung 0,5 mg/L 2,4-D mampu menghasilkan kalus yang optimal. Rudiyanto *et al.* (2019) melaporkan bahwa penambahan 2 mg/L BAP dan 0,5 mg/L 2,4-D menghasilkan persentase tertinggi terbentuknya kalus uwi ungu (*Dioscorea alata*) yang dikultur pada medium MS. Penelitian awal kultur *in vitro* *Dioscorea esculenta* telah dilakukan berkaitan dengan parameter induksi kalus antara lain persentase berkalus, waktu lama berkalus serta morfologi kalus gembili (Habibah *et al.*, 2021).

# BAB III

## METODE PENELITIAN

### 3.1. Alat dan Bahan

#### 3.1.1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

Tabel 3.1 Alat-Alat Penelitian

No	Alat	Spesifikasi	Kegunaan
1	Botol kultur beserta tutup	250 ml	Pembuatan media
2	<i>Beaker glass</i>	(Iwaki) 1000 ml	Pembuatan media
3	Gelas Ukur	(Iwaki) 100 ml	Pembuatan media
4	<i>Erlenmayer</i>	(Iwaki) 1000 ml	Pembuatan media
5	<i>Autoclave manual</i>	<i>All American</i>	Sterilisasi alat dan media yang dilengkapi dengan pengukur tekanan, suhu dan waktu
6	Botol <i>flacon</i>	12 ml	Tempat sampel pada saat ekstraksi
7	<i>Laminar Air Flow (LAF)</i>	dengan UV, <i>tube lamp</i> (TL) dan <i>blower</i>	Tempat untuk menanam eksplan, dan subkultur, kondisi aseptik
8	Pinset	14cm	Alat untuk menanam
9	<i>Scalpel</i>	No.4	Alat untuk menanam
10	Kertas pH	Merck Universal	Mengukur pH medium
11	Rak Kultur		Inkubasi kalus
12	<i>Thermometer</i> ruang		Mengukur suhu ruang
13	Higrometer	skala 10 s.d. 100 %	Mengukur kelembaban
14	Oven	Memmert	Pengeringan ekstrak
15	Mikropipet skala	200-1000 $\mu$ l, 20-20 $\mu$ l, 20-5 $\mu$ l Dragon Lab	Mengambil sampel berbentuk cair
16	Pastel dan mortar		Menggerus kalus

No	Alat	Spesifikasi	Kegunaan
17	Spektrofotometer UV-Visible	Perkin Elmer, lambda 25	Analisis serapan sampel
18	Mikroskop Stereo	Nikon	Untuk mengamati morfologi kalus
19	Neraca analitik	Ketelitian 0,01 g	Untuk menimbang
20	Lemari es	Toshiba	Menyimpan bahan-bahan
21	Vortex		Menghomogenkan larutan ekstrak
22	<i>hot plate -stirer</i>		Memanaskan medium



Gambar 3.1 Umbi gembili yang digunakan sebagai eksplan

### 3.1.2. Bahan

Bahan-bahan yang diperlukan dalam penelitian ini adalah:

Tabel 3.2 Bahan-Bahan Penelitian

No	Bahan	Spesifikasi	Kegunaan
1	Umbi gembili	umbi gembili yang tumbuh di desa Somagede Banyumas	
2	Media Murashige & Skoog	SnPlants	Media
4	2,4- <i>Dichlorophenoxyacetic acid</i> (2,4-D)	Phytotechlab	Zat Pengatur Tumbuh
5	<i>Kinetin</i>	Phytotechlab	Zat Pengatur Tumbuh
6	Agar-agar powder	Swallow	Bahan media
7	Sukrosa		Bahan media
8	<i>Myoinositol</i>	Phytotechlab	Bahan media
9	Bakterisida	Velimek	Bahan sterilisasi eksplan

No	Bahan	Spesifikasi	Kegunaan
10	Fungisida	Top Bacterial	Bahan sterilisasi eksplan
11	Kertas saring		Penyaring ekstrak
12	Akuades		Pelarut
13	Metanol HCl 1%	Merck	Bahan ekstraksi
14	HCl pekat 2N	Merck	Bahan ekstraksi
15	NaNO <sub>2</sub> 5%	Merck	Bahan untuk analisis flavonoid
16	AlCl <sub>3</sub> 10%	Merck	Bahan untuk analisis flavonoid
17	NaOH 4%	Merck	Bahan untuk analisis flavonoid
18	Alkohol 70%	Merck	sterilisasi alat dan eksplan
19	Detergen	Dettol	sterilisasi eksplan
20	agen pemutih	Bayclin	sterilisasi eksplan
21	quercetin	Merck	senyawa standar untuk analisis flavonoid
22	reagen Folin–Ciocalteu		bahan untuk uji fenolik
23	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Merck	bahan untuk uji fenolik
24	Larutan DPPH		bahan untuk uji aktivitas antioksidan

### 3.2. Variabel Penelitian

#### 3.2.1. Variabel Bebas

Variabel bebas yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

- Konsentrasi ZPT: Kinetin (0,5 ppm dan 1 ppm), 2,4-D (0,5 ppm dan 1 ppm).
- Kondisi pencahayaan: terang dan gelap.
- Umur kalus (3 dan 4 bulan)

#### 3.2.2. Variabel Terikat

Variabel terikat yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

- Berat kering
- Kandungan fenolik
- Kandungan flavonoid
- Aktivitas antioksidan

#### 3.2.3. Variabel Kendali

Variabel kendali yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

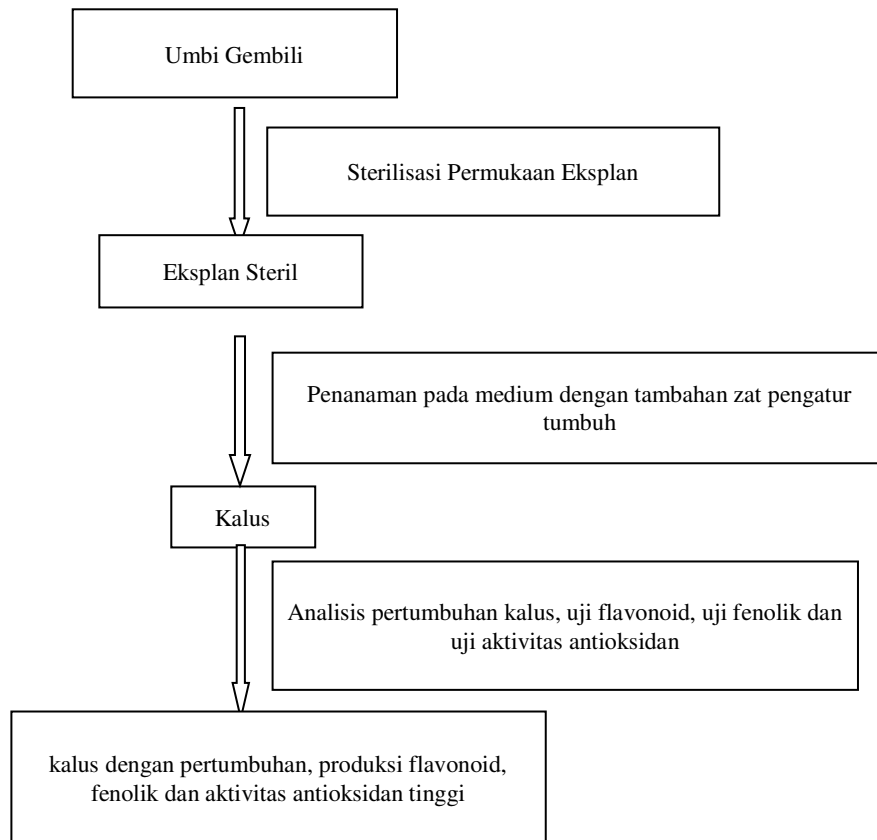
- eksplan umbi gembili,
- media Murashige dan Skoog (MS),
- suhu inkubasi 24 °C.

### 3.3. Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian menggunakan rancangan acak kelompok (RAK) yang terdiri atas dua faktor. Faktor pertama adalah pemberian kombinasi zat pengatur tumbuh berupa Kinetin dan 2,4-D dengan konsentrasi yang bervariasi (Kinetin 1 ppm + 2,4-D 1 ppm; Kinetin 1 ppm + 2,4-D 0,5 ppm; Kinetin 0,5 ppm + 2,4-D 0,5 ppm; Kinetin 0,5 ppm + 2,4-D 1 ppm) dan kondisi pencahayaan (gelap; terang). Masing-masing perlakuan dilakukan 10 kali ulangan.

### 3.4. Alur Penelitian

Penelitian dilaksanakan sesuai dengan diagram alir pada Gambar 13.



Gambar 3.2. Alur Penelitian yang dilakukan



### 3.4.1. Pembuatan Media Murashige and Skoog (MS)

Pembuatan media Murashige and Skoog (MS) untuk 1 liter dilakukan dengan cara: stok medium MS ditimbang sebanyak 4,43 gram, sukrosa 30 g/L, dan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer yang telah berisi akuades 100 mL. Selanjutnya ditambahkan larutan stok Kinetin dan 2,4-D sesuai dengan perlakuan dan ditambahkan akuades hingga volume mencapai 1 L. Larutan diaduk hingga homogen. Derajat keasaman (pH) media diatur hingga mencapai 5,8. Apabila pH lebih dari 5,8 maka ditambahkan HCl 0,1 N dan apabila pH kurang dari 5,8 larutan ditambah NaOH 0,1 N. Tahap berikutnya media ditambah agar 8 g/L dan dipanaskan di atas penangas air sambil diaduk hingga larut dan homogen. Medium dituang ke dalam botol kultur, ditutup rapat dan selanjutnya disterilisasi dalam autoklaf dengan suhu 121 °C selama 15 menit.

Tabel 3.3 Komposisi medium MS

Senyawa komponen media	Konsentrasi dalam media MS (mg/L)
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1.650
KNO <sub>3</sub>	1.900
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	440
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,25
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025
KI	0,83
MnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	16,9
MnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	16,9
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,6
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370
CuSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,025
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27,8
Na <sub>2</sub> EDTA	37,3
Thiamin-HCl	0,1
Piridoksin-HCl	0,5
Asam nikotinal (Glisin)	0,5 2,0
Mioinositol	100

### 3.4.2. Sterilisasi Alat dan Media

Alat-alat gelas dan alat diseksi (pinset dan scalpel) disterilisasi menggunakan autoklaf dengan suhu 121 °C dengan tekanan 1,5 atm selama 30 menit.

### 3.4.3. Sterilisasi Eksplan dan Penanaman

Eksplan diambil dari bagian umbi gambili. Eksplan dicuci di bawah air mengalir sambil dibersihkan dan dikupas kulitnya. Selanjutnya umbi dipotong sebesar kurang lebih 3 cm<sup>2</sup>. Eksplan disterilisasi menggunakan detergen, bakterisida dan fungisida untuk tahap awal. Selanjutnya eksplan dimasukkan ke dalam LAF untuk tahap sterilisasi berikutnya. Di dalam LAF, eksplan disterilisasi menggunakan agen pemutih dengan merek Bayclin dan dibilas menggunakan akuades steril sebanyak 3 kali. Eksplan steril dipotong dengan ukuran 2 cm x 2 cm x 0,5 cm dan ditanam pada medium MS steril yang mengandung ZPT sesuai perlakuan yang telah ditentukan.

### 3.4.4. Inkubasi

Botol yang telah berisi eksplan diletakkan di atas rak inkubasi dengan suhu ruang berkisar 24°C. Sebagian eksplan diletakkan dibawah pencahayaan lampu dengan daya 16 watt untuk perlakuan terang dan diletakkan di rak yang telah ditutup menggunakan plastik gelap tanpa pencahayaan pada perlakuan gelap. Inkubasi dilaksanakan selama 3 dan 4 bulan.



Kondisi Terang



Kondisi Gelap

Gambar 3.3 Tempat inkubasi untuk induksi kalus gambili (koleksi pribadi)

### **3.4.5. Penentuan Berat Kering Sampel**

Penentuan pertumbuhan kalus dapat dilihat dari berat kering kalus. Berat kering kalus diambil dari kalus umur 3 dan 4 bulan. Kalus di keringkan menggunakan oven pada suhu 40 °C sampai berat konstan.

### **3.4.6. Metode Analisis Kandungan Senyawa Bioaktif dan Penentuan Aktivitas Antioksidan**

#### ***Preparasi Sampel***

Setelah 30 hari sel dipanen dan dikeringkan dalam oven selama 48 jam pada suhu 60°C. Uji kandungan senyawa dilakukan dengan cara: sel kering di tumbuk dengan mortar dan *pestle* sehingga menjadi bubuk. Bubuk dimaserasi dengan air atau methanol selama 2 hari. Ekstrak kemudian dikeringkan dan diresuspensi dalam air atau methanol. Sampel di filter dengan menggunakan filter ukuran 0,45 µ. Sampel kemudian di analisis secara kualitatif dengan KLT untuk deteksi golongan senyawa bioaktif. Uji kuantitatif senyawa fenolik dilakukan dengan spektrofotometer dengan menggunakan asam galat sebagai senyawa standar.

#### ***Ekstraksi***

Metode ekstraksi flavonoid yang digunakan adalah metode Hao *et al.* (2009). Kalus kering (0,2 g) di tumbuk dengan mortar dan *pestle* sehingga menjadi bubuk. Bubuk diekstraksi menggunakan metanol yang mengandung 1%(v/v) HCl, diikuti dengan penambahan 2 N HCl (dengan volume yang sama) dan diinkubasi selama satu jam pada suhu 90°C. Ekstrak kemudian dikeringkan dan diresuspensi dalam metanol. Kandungan flavonoid secara kuantitatif dianalisis menggunakan spektrofotometer.

#### ***Penentuan Kandungan Flavonoid***

Kandungan flavonoid total ditentukan menggunakan prosedur Zou *et. al.*, (2004). Sebanyak 0,5 ml larutan sampel atau standar dicampur dengan 2 mL akuades dan kemudian 0,15 mL larutan NaNO<sub>2</sub> 5% ditambahkan. Setelah 6 menit, 0,15 mL larutan AlCl<sub>3</sub> 10% ditambahkan dan dibiarkan selama 6 menit, kemudian 2 mL larutan NaOH 4%

ditambahkan pada campuran. Air ditambahkan segera sehingga volume total menjadi 5 ml, kemudian campuran di *vortex* supaya homogen dan didiamkan selama 15 menit. Absorbansi campuran ditentukan pada  $\lambda$  510 nm. Quercetin digunakan sebagai standar.

#### ***Penetapan Kandungan Fenol Total dengan Metoda Folin–Ciocalteu (Orak, 2006)***

Ditimbang 100 mg ekstrak kemudian dilarutkan sampai 10 mL dengan akuades sehingga diperoleh konsentrasi 10 mg/mL. Dari konsentrasi 10 mg/mL dipipet 1 mL dan diencerkan dengan akuades hingga 10 mL dan diperoleh konsentrasi ekstrak 1 mg/mL. Dipipet 0,2 mL ekstrak, ditambahkan 15,8 mL akuades dan 1 mL reagen *Folin–Ciocalteu* lalu dikocok. Didiamkan selama 8 menit kemudian ditambahkan 3 mL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 10% ke dalam campuran. Didiamkan larutan selama 2 jam pada suhu kamar. Diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang serapan maksimum 765 nm. Dilakukan 3 (tiga) kali pengulangan sehingga kadar fenol yang diperoleh hasilnya didapat sebagai mg ekuivalen asam galat/g sampel segar.

#### ***Penentuan Aktivitas Antioksidan***

Menyiapkan larutan *stock* DPPH 50 ppm. Larutan *stock* DPPH dibuat dengan melarutkan 5 mg padatan DPPH ke dalam 100 ml metanol PA. Kemudian disiapkan larutan perbandingan, yaitu larutan kontrol yang berisi 2 ml metanol PA dan 1 ml larutan DPPH 50 ppm. Untuk sampel uji, disiapkan masing-masing 2 ml larutan sampel dan 2 ml larutan DPPH. Kemudian, di inkubasi selama 30 menit pada suhu 27°C hingga terjadi perubahan warna dari aktivitas DPPH. Semua sampel dibuat triplo. Semua sampel yaitu sampel ekstrak yang telah di inkubasi di uji nilai absorbansinya menggunakan spektrofotometer Uv-vis pada panjang gelombang 517 nm.

#### **3.4.7. Analisis Data**

Data pengamatan yang diperoleh berupa data kualitatif dan data kuantitatif. Data kuantitatif berupa berat kering, produksi flavonoid, fenolik dan aktivitas antioksidan. Data kualitatif dianalisis secara deskriptif meliputi morfologi kalus. Data kuantitatif dianalisis menggunakan SPSS.

# BAB IV

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1. Induksi Kalus

Induksi kalus gembili dari eksplan umbi telah berhasil dilakukan. Semua perlakuan yang diuji ternyata menghasilkan kalus dengan berbagai ukuran. Induksi kalus dimulai pada bagian yang mengalami luka yaitu bagian umbi yang mengalami pemotongan. Menurut Ahmad *et al.* (2010) proliferasi sel pada bagian eksplan yang terluka berkaitan dengan akumulasi auksin pada titik luka, yang menstimulasi proliferasi sel dengan kehadiran zat pengatur tumbuh. Pertumbuhan kalus kemudian meluas sehingga seluruh bagian eksplan berubah menjadi kalus. Proses pertumbuhan kalus ini merupakan suatu proses dediferensiasi yang diinduksi oleh zat pengatur tumbuh. Proses dediferensiasi adalah suatu proses perubahan sel atau kumpulan sel dari yang mempunyai sifat sebagai bagian dari organ atau jaringan (terdiferensiasi) menjadi sel atau kumpulan sel yang kehilangan fungsi atau bentuk khususnya atau menjadi meristematik kembali (Hapsoro & Yusnita, 2018). Sel atau jaringan meristematis ini dapat diinduksi menjadi organ tertentu dengan penambahan ZPT yang tepat. Pada kultur kalus, sifat meristematik ini tetap dipelihara dan menghasilkan kumpulan sel yang tidak terorganisasi. Sel kalus akan melakukan pembelahan terus menerus. Kultur Kalus dapat digunakan untuk produksi metabolit sekunder (Sing *et al.*, 2014, Habibah *et al.*, 2016, Habibah *et al.*, 2018, Habibah *et al.*, 2020). Hasil penelitian menunjukkan bahwa ZPT kinetin yang dikombinasikan dengan 2,4 D dapat menginduksi proses dediferensiasi pada kisaran konsentrasi 0,5 ppm sampai 1 ppm. Zat pengatur tumbuh yang diperlukan untuk induksi kalus berbeda-beda tergantung jenis eksplan dan spesies tumbuhan (Veraplakorn, 2016, Mereu *et al.*, 2019, Habibah *et al.*, 2019). Pada

saffron, perkembangan kalus sangat dipengaruhi oleh hormon (Mereu *et al.*, 2019). Induksi kalus tomat sangat dipengaruhi genotipe, tipe eksplan dan komponen kultur (Khalilueva *et al.*, 2014). Pembentukan kalus pada rejasa (*Elaeocarpus grandiflorus*) juga sangat dipengaruhi oleh zat pengatur tumbuh (Habibah *et al.*, 2019). Pengaruh zat pengatur tumbuh pada induksi kalus juga dilaporkan pada kultur absinthium (Lata *et al.*, 2014). Induksi kalus pada *Gardenia resinifera* dengan eksplan potongan biji dilaporkan terbentuk pada medium dengan penambahan 2,4-D dan BAP, sedangkan pada eksplan internodus membutuhkan NAA dan BAP (Lakshmi & Reddy, 2012). Hal serupa juga dilaporkan pada *Rollinia mucosa*. Penggunaan 2,4-D dan picloram dilaporkan pada induksi kalus *Rollinia mucosa* (Figueiredo, *et al.*, 2000). Perlu adanya optimasi jenis dan konsentrasi ZPT untuk mendapatkan pertumbuhan kalus yang maksimal. Penggunaan 2,4-D sangat sering dilaporkan karena 2,4-D merupakan auksin yang sangat kuat sehingga mampu menginduksi pertumbuhan kalus pada berbagai tumbuhan. Induksi kalus pada kakao berhasil pada medium kultur dengan penambahan 2,4 -D (Asmila *et al.*, 2017). Induksi kalus pada *Stelechocarpus burahol* dan *Elaeocarpus grandiflorus* juga berhasil dengan baik pada medium dengan penambahan 2,4-D (Habibah *et al.*, 2016, Habibah *et al.*, 2019). Induksi kalus pada *Aquilaria malaccensis* juga berhasil pada medium dengan penambahan 2,4-D dan kinetin (Saikin *et al.*, 2013). Keberhasilan penggunaan 2,4-D dan kinetin pada induksi kalus juga dilaporkan pada kultur *Cassia occidentalis* Vats & Kamal, 2014).

Induksi kalus diatur oleh mekanisme pengaturan siklus sel yang kompleks. Pada pembentukan kalus yang diinduksi auksin, sinyal auksin ditransduksi melalui faktor transkripsi *Auxin Response Factor* (ARF) terutama ARF7 dan ARF19, untuk mengaktifkan ekspresi dari faktor transkripsi *LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN* (LBD). LBD menginduksi *E2 PROMOTER BINDING FACTOR a* (E2Fa), faktor transkripsi yang memegang peran kunci dalam masuknya kembali sel ke siklus sel (Ikeuchi *et al.*, 2013). Gen-gen penyandi *CYCLIN-DEPENDENT KINASES* merupakan gen yang memegang peranan penting masuknya sel ke siklus sel dengan mendorong sel pada fase G1 masuk ke fase S dan sel pada G2 masuk pada fase M. Pada kehadiran faktor pertumbuhan seperti auksin, D-type cyclins (CYCD) akan berasosiasi A-type CDK (CDKA),

membentuk kompleks CDKA/CYCD. Kompleks ini kemudian diaktivasi melalui proses fosforilasi oleh jalur *CDK-activating kinase*, yang melibatkan CDKF dan CDKD berasosiasi dengan H-type cyclin (CYCH). Kompleks CDKA/CYCD yang telah aktif menginduksi transisi dari fase G1 ke fase S (Inz'e & Veylder, 2006).

Auksin mengaktifkan kompleks heterodimeric dari protein AXR1 and ECR1, yang berlokasi di dalam nukleus dan mengaktifkan ubiquitin–protein ligase (E3\*). Hal ini mendorong proses *ubiquitination* dari protein represor spesifik. Proses *ubiquitination* dari protein represor (yang terikat pada faktor transkripsi gen-gen yang diatur oleh auksin) menginduksi pemecahan represor oleh proteosom. Hilangnya represor menyebabkan transkripsi dari gen-gen tersebut (Sonnewald, 2013). Pada proses pembelahan sel, auksin dan sitokinin mempunyai peranan penting dalam transisi dari fase G2 ke M karena hormon ini mengaktifkan *CDC25-like phosphatase* yang terlibat dalam transisi siklus sel (Pereira *et al.*, 2012). Aktifnya gen akan mendorong sel untuk melakukan pembelahan.

Awal pembentukan kalus dimulai dengan terbentuknya sel-sel penutup luka yang berproliferasi membentuk gumpalan sel yang berwarna putih kekuningan (Gambar 4.1). Dengan berjalannya waktu kalus akan berubah menjadi kecokelatan, karena adanya peningkatan kandungan senyawa fenolik atau metabolit sekunder lainnya di dalam kalus. Senyawa fenolik bereaksi dengan oksigen dengan bantuan enzim polifenol oksidase menghasilkan ortho-diquinones yang sangat reaktif. Ortho-diquinones bereaksi secara spontan dengan protein dan komponen selular lainnya membentuk pigmen gelap yang disebut melanin (Tang & Newton, 2004). Baik pada kalus yang ditumbuhkan pada kondisi gelap maupun terang dihasilkan fenolik. Tetapi menurut Kumari *et al.*, (2009), enzim penting dalam biosintesis asam fenolik akan meningkat aktivitasnya jika terinduksi oleh intensitas cahaya yang tinggi. Semakin tua umur kalus, akumulasi fenolik akan semakin tinggi.





Gambar 4.1. Kalus mulai terbentuk pada bagian eksplan yang terluka

Morfologi kalus pada kondisi gelap dan terang yang dipanen pada umur 3 dan 4 bulan dapat dilihat pada Gambar 4.2, 4.3, 4.4 dan 4.5. Kalus yang dihasilkan mempunyai tekstur meremah. Kalus meremah mempunyai ruang antar sel yang lebar sehingga mudah untuk terlepas. Kalus meremah merupakan bahan yang sangat baik untuk kultur suspensi sel. Kalus yang dipelihara dalam kondisi terang mempunyai warna kehijauan yang menunjukkan adanya klorofil. Hal yang sama juga dilaporkan pada kalus krisan. Kalus krisan yang dipelihara pada kondisi gelap menghasilkan warna yang lebih terang dan cenderung pucat jika dibandingkan dengan kalus yang dipelihara pada kondisi pencahayaan yang memadai atau terang (Setiawati *et al.*, 2020). Kalus berwarna putih menunjukkan adanya plastid yang berisi bulir-bulir pati dan belum terkandung kloroplas di dalamnya. Plastid perlahan akan berubah menjadi sistem membran yang jelas kemudian menjadi proto klorofil dengan adanya cahaya, hal inilah yang menyebabkan kalus berwarna kekuningan perlahan menjadi hijau. Zat pengatur tumbuh berupa sitokinin dan cahaya merupakan stimulus yang mampu memacu proses diferensiasi proplastid menjadi plastid yang mengandung klorofil, sehingga terbentuklah kalus yang berwarna hijau (Faramayuda *et al.*, 2016), Gamborg dalam Kherasani, 2017). Cortleven *et al.* (2016) menjelaskan bahwa selain berperan dalam proses fisiologis dan perkembangan seperti siklus sel, sitokinin juga berperan dalam perkembangan kloroplas. Kloroplas merupakan organel yang penting dalam proses fotosintesis. Kloroplas berkembang dari proplastida yang berada pada sel meristem yang belum matang. Pada kondisi gelap, proplastida berkembang menjadi etioplas yang memiliki struktur semikristalin yang disebut prolamelar. Ketika terpapar cahaya, prolamelar akan berkembang dan menyebar, membran tilakoid terbentuk, kloroplas berfungsi secara sempurna dan berkembang.



Kin 0,5 ppm + 2.4-D 0,5 ppm



Kin 1 ppm + 2.4-D 0,5 ppm



Kin 0,5 ppm + 2.4-D 1 ppm



Kin 1 ppm + 2.4-D 1 ppm

Gambar 4.2 Kalus *Dioscorea esculenta* umur 3 bulan yang dipelihara pada medium MS dengan penambahan 2,4-D dan kinetin dalam kondisi gelap



Kin 0,5 ppm + 2.4-D 0,5 ppm



Kin 1 ppm + 2.4-D 0,5 ppm



Kin 0,5 ppm + 2.4-D 1 ppm



Kin 1 ppm + 2.4-D 1 ppm

Gambar 4.3 Kalus *Dioscorea esculenta* umur 4 bulan yang dipelihara pada medium MS dengan penambahan 2,4-D dan kinetin dalam kondisi gelap



Kin 0,5 ppm + 2.4-D 0,5 ppm



Kin 1 ppm + 2.4-D 0,5 ppm



Kin 0,5 ppm + 2.4-D 1 ppm



Kin 1 ppm + 2.4-D 1 ppm

Gambar 4.4 Kalus *Dioscorea esculenta* umur 3 bulan yang dipelihara pada medium MS dengan penambahan 2,4-D dan kinetin dalam kondisi terang



Kin 0,5 ppm + 2.4-D 0,5 ppm



Kin 1 ppm + 2.4-D 0,5 ppm



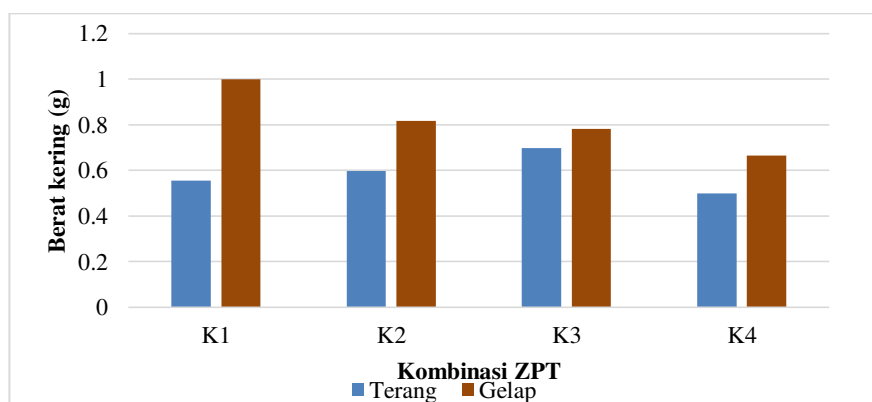
Kin 0,5 ppm + 2.4-D 1 ppm



Kin 1 ppm + 2.4-D 1 ppm

Gambar 4.5 Kalus *Dioscorea esculenta* umur 4 bulan yang dipelihara pada medium MS dengan penambahan 2,4-D dan kinetin dalam kondisi terang

Pertumbuhan kalus dapat diamati dari berat kering. Berat kering diperoleh dari hasil penimbangan kalus yang telah dikeringkan menggunakan oven sampai beratnya konstan. Kalus gembili yang dipelihara pada medium MS dengan penambahan 2,4-D dan kinetin pada kondisi terang dan gelap disajikan pada Gambar 4.6 dan 4.7 serta Tabel 4.1 dan Tabel 4.5. Berdasarkan Gambar 4.6, pada kalus umur 3 bulan dalam kondisi gelap, pertumbuhan tertinggi diperoleh dari eksplan yang ditanam pada medium MS dengan penambahan kinetin 0,5 ppm dan 2,4-D 0,5 ppm. Sedangkan untuk kondisi terang, kombinasi kinetin 1 ppm + 2,4-D 0,5 ppm. Pertumbuhan paling optimal dari keseluruhan perlakuan adalah kombinasi kinetin 0,5 ppm dan 2,4-D 0,5 ppm dalam kondisi gelap. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kondisi gelap mendorong pertumbuhan kalus menjadi lebih baik dibandingkan pada kondisi terang. Pada kondisi gelap, kombinasi yang seimbang antara auksin dan sitokinin menghasilkan pertumbuhan kalus yang terbaik. Pada kondisi terang, sitokinin yang lebih tinggi daripada auksin menghasilkan pertumbuhan terbaik.



Gambar 4.6 Berat kering kalus gembili umur 3 bulan yang dipelihara pada medium MS dengan penambahan 2,4-D dan kinetin pada kondisi terang dan gelap.

- K1 : Kinetin 0,5 ppm + 2,4-D 0,5 ppm
- K2 : Kinetin 0,5 ppm + 2,4-D 1 ppm
- K3 : Kinetin 1 ppm + 2,4-D 0,5 ppm
- K4 : Kinetin 1 ppm + 2,4-D 1 ppm

Tabel 4.1 Berat kering kalus gambili umur 3 bulan yang dipelihara pada medium MS dengan penambahan 2,4-D dan kinetin pada kondisi terang dan gelap

Pencahayaannya	ZPT (ppm)		Berat Kering (gram) ± SD
	Kinetin	2,4-D	
Terang	1	1	0.498 ± 0.034
		0.5	0.697 ± 0.071
	0.5	1	0.598 ± 0.240
		0.5	0.555 ± 0.108
Gelap	1	1	0.666 ± 0.040
		0.5	0.781 ± 0.531
	0.5	1	0.818 ± 0.069
		0.5	0.999 ± 0.171

Hasil uji statistik 2 arah untuk parameter berat kering kalus umur 3 bulan dapat dilihat pada Tabel 4.2, Tabel 4.3 dan Tabel 4.4.

Tabel 4.2 Hasil uji statistik perbandingan berat kering berdasarkan kondisi

Kondisi	Total Rata-rata	Selisih total Rata-rata	Signifikansi	Kesimpulan
Gelap	.820	0.319	0.000	Ada perbedaan
Terang	.501			

Hasil uji statistik menunjukkan bahwa terdapat perbedaan rata-rata berat kering Kalus Gambili kondisi terang dan kondisi gelap dengan selisih rata-rata 0.319. Nilai total rata-rata berat kering Kalus Gambili pada kondisi gelap lebih tinggi daripada nilai total rata-rata berat kering Kalus Gambili pada kondisi terang.

Tabel 4.3 Hasil uji statistik perbandingan berat kering berdasarkan perlakuan

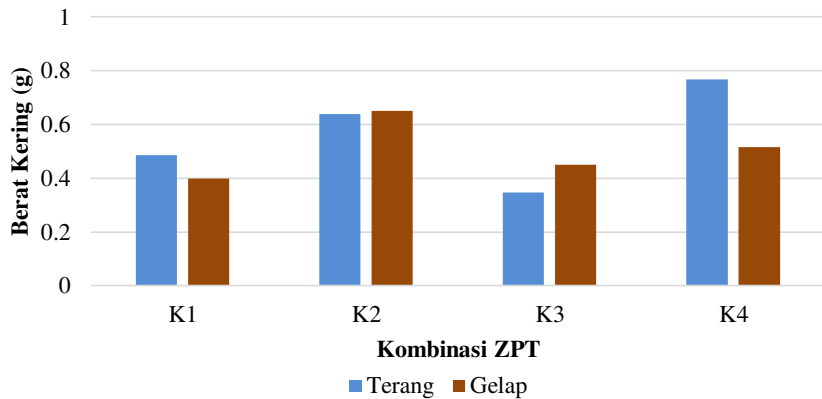
Perlakuan	Total Rata-rata	Signifikansi	Kesimpulan
Kinetin 1 ppm + 2.4-D 1 ppm	0.599	0.172	Tidak ada perbedaan
Kinetin 1 ppm + 2.4-D 0.5 ppm	0.685		
Kinetin 0.5 ppm + 2.4-D 1 ppm	0.557		
Kinetin 0.5 ppm + 2.4-D 0.5 ppm	0.679		

Hasil uji statistik menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikansi berat kering berdasarkan perlakuan yang diberikan

Tabel 4.4 Hasil uji statistik perbandingan berat kering berdasarkan kondisi dan perlakuan yang diberikan

Kondisi	Perlakuan	Nilai Rata-rata	Kelompok	Signifikansi	Kesimpulan
Terang	Kin 1 ppm + 2,4-D 1 ppm	0.424	D	0.018	Terdapat perbedaan
	Kin 1 ppm + 2,4-D 0.5 ppm	0.645	D		
	Kin 0.5 ppm + 2,4-D 1 ppm	0.413	C dan D		
	Kin 0.5 ppm + 2,4-D 0.5 ppm	0.501	B, C dan D		
Gelap	Kin 1 ppm + 2,4-D 1 ppm	0.861	A, B dan C		
	Kin 1 ppm + 2,4-D 0.5 ppm	0.746	A, B dan C		
	Kin 0.5 ppm + 2,4-D 1 ppm	0.726	A dan B		
	Kin 0.5 ppm + 2,4-D 0.5 ppm	0.945	A		

Hasil uji statistik menunjukkan bahwa terdapat perbedaan rata-rata berat kering kalus gambili di antara kondisi dan perlakuan yang diberikan. Perbedaan ditunjukkan dengan kelompok. Nilai rata-rata berat kering kalus gambili yang sama akan dijadikan menjadi satu kelompok yang sama. Terlihat bahwa perlakuan dengan kondisi yang sama akan masuk pada kelompok yang sama. Berat kering yang memiliki nilai rata-rata paling tinggi adalah kalus gambili yang diberi perlakuan kinetin 0,5 ppm + 2,4-D 0,5 ppm dengan kondisi gelap yang sangat berbeda secara signifikan dengan berat kering. Kalus gambili dengan nilai terendah yang diberi perlakuan kinetin 1 ppm + 2,4-D 1 ppm dan kinetin 1 ppm + 2,4-D 0,5 ppm dengan kondisi terang.



Gambar 4.7 Berat kering kalus gambeli umur 4 bulan yang dipelihara pada medium MS dengan penambahan 2,4-D dan kinetin pada kondisi terang dan gelap

- K1 : Kinetin 0,5 ppm + 2,4-D 0,5 ppm
- K2 : Kinetin 0,5 ppm + 2,4-D 1 ppm
- K3 : Kinetin 1 ppm + 2,4-D 0,5 ppm
- K4 : Kinetin 1 ppm + 2,4-D 1 ppm

Pada umur 4 bulan, pada kondisi terang, kombinasi yang seimbang antara auksin dan sitokinin menghasilkan pertumbuhan kalus yang terbaik (Tabel 4.5). Pada kondisi gelap, auksin yang lebih tinggi daripada sitokinin menghasilkan pertumbuhan terbaik. Berat kalus umur 4 bulan menurun bila dibandingkan dengan berat kalus umur 3 bulan. Hal ini kemungkinan disebabkan karena adanya sel tua dan mengalami kematian semakin banyak dengan bertambahnya umur kultur.

Tabel 4.5 Berat kering kalus gambeli umur 4 bulan yang dipelihara pada medium MS dengan penambahan 2,4-D dan kinetin pada kondisi terang dan gelap

Pencahayaan	ZPT (ppm)		Berat Kering (gram) ± SD
	Kinetin	2,4-D	
Terang	1	1	0.768 ± 0.281
	0.5	0.5	0.348 ± 0.088
		1	0.638 ± 0.437
		0.5	0.485 ± 0.259

Pencahayaannya	ZPT (ppm)		Berat Kering (gram) ± SD
	Kinetin	2,4-D	
Gelap	1	1	0.516 ± 0.202
	0.5	0.5	0.450 ± 0.131
		1	0.650 ± 0.098
		0.5	0.399 ± 0.046

Hasil uji statistik 2 arah untuk parameter berat kering kalus umur 4 bulan dapat dilihat pada Tabel 4.6, Tabel 4.7 dan Tabel 4.8.

Tabel 4.6 Hasil uji statistik perbandingan berat kering berdasarkan kondisi

Kondisi	Total Rata-rata	Selisih total Rata-rata	Signifikansi	Kesimpulan
Gelap	0.547	0.024	0.721	Tidak ada perbedaan
Terang	0.571			

Simpulan: tidak terdapat perbedaan rata-rata berat kering kalus gambili kondisi terang dan kondisi gelap dengan selisih rata-rata 0.024.

Tabel 4.7 Hasil uji statistik perbandingan berat kering berdasarkan perlakuan

Perlakuan	Total Rata-rata	Signifikansi	Kesimpulan
Kinetin 1 ppm + 2.4-D 1 ppm	0.566	0.723	Tidak ada perbedaan
Kinetin 1 ppm + 2.4-D 0.5 ppm	0.495		
Kinetin 0.5 ppm + 2.4-D 1 ppm	0.611		
Kinetin 0.5 ppm + 2.4-D 0.5 ppm	0.564		

Simpulan: tidak terdapat perbedaan yang signifikansi berat kering berdasarkan perlakuan yang diberikan



Tabel 4.8 Hasil uji statistik Perbandingan berat kering berdasarkan kondisi dan perlakuan yang diberikan

Kondisi	Perlakuan	Nilai Rata-rata	Signifikansi	Kesimpulan
Terang	Kinetin 1 ppm + 2.4-D 1 ppm	0.619	0.350	Tidak terdapat perbedaan
	Kinetin 1 ppm + 2.4-D 0.5 ppm	0.406		
	Kinetin 0.5 ppm + 2.4-D 1 ppm	0.702		
	Kinetin 0.5 ppm + 2.4-D 0.5 ppm	0.567		
	Kinetin 1 ppm + 2.4-D 1 ppm	0.523		
Gelap	Kinetin 1 ppm + 2.4-D 0.5 ppm	0.584		
	Kinetin 0.5 ppm + 2.4-D 1 ppm	0.520		
	Kinetin 0.5 ppm + 2.4-D 0.5 ppm	0.562		

Simpulan: Tidak terdapat perbedaan rata-rata berat kering kalus gambili di antara kondisi dan perlakuan yang diberikan.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kalus yang dipelihara pada kondisi gelap umur 4 bulan mempunyai berat kering yang lebih rendah daripada kalus umur 3 bulan. Hal ini kemungkinan disebabkan karena pada umur 4 bulan, kandungan fenolik meningkat sehingga menghambat pertumbuhan kalus dan menyebabkan kematian sel. Dugaan ini muncul karena adanya *browning* pada kalus umur 4 bulan. Kumar *et al.*, (2015) menyatakan bahwa sekresi senyawa fenolik di dalam medium mempunyai efek menghambat pertumbuhan kalus dan kemampuan regenerasi pada *Gossypium hirsutum*. Pada tumbuhan, sekresi fenolik dari akar akan menghambat pertumbuhan rhizopora yang ada di sekitarnya. *Browning* pada kalus akibat oksidasi fenolik mengurangi pertumbuhan kalus (Tang & Newton, 2004). Kalus pada awal terbentuk berwarna putih dan akan berubah menjadi kecokelatan, karena adanya peningkatan kandungan senyawa fenolik atau metabolit sekunder lainnya di dalam kalus. Senyawa fenolik bereaksi dengan oksigen dengan bantuan enzim polifenol oksidase menghasilkan ortho-diquinones yang sangat reaktif. Ortho-diquinones bereaksi secara spontan dengan protein dan komponen selular lainnya membentuk pigmen gelap yang disebut melanin (Tang & Newton, 2004).

Kalus hijau mengandung antosianin tertinggi diikuti oleh kalus berwarna coklat dan krem. Tetapi kandungan fenolik total kalus berwarna krem mempunyai kandungan fenolik lebih tinggi dibanding kalus yang berwarna coklat. Sedangkan kalus berwarna hijau mengandung fenolik total tertinggi. Kalus berwarna hijau juga mengandung karetonoid dan

klorofil total tertinggi dan mempunyai potensi antioksidan tertinggi. Analisis korelasi menunjukkan bahwa bioaktivitas yang terdapat ekstrak berkorelasi sangat kuat dengan pigmen bioaktif yang muncul pada kalus (Ashokhan *et al.*, 2019).

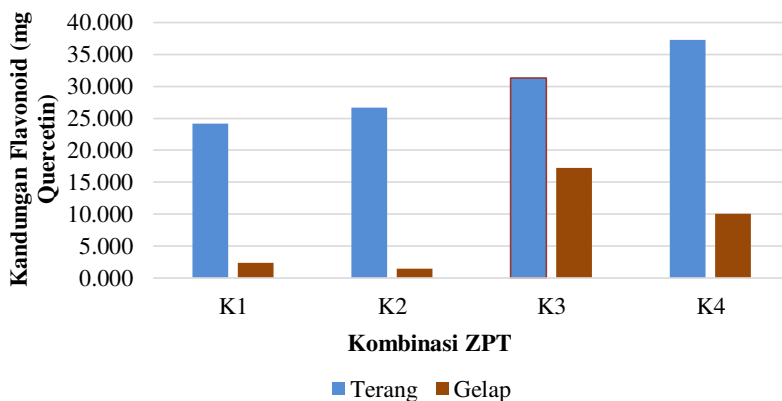
Berdasarkan keseluruhan data yang dianalisis, kondisi optimal untuk pertumbuhan kalus gembili dari eksplan umbi menggunakan medium MS adalah penambahan kombinasi zat pengatur tumbuh kinetin 0,5 ppm + 2,4-D 0,5 ppm dalam kondisi gelap dengan umur panen 3 bulan yaitu sebesar 0,999 gram. Kondisi optimal ini berdasarkan pada parameter berat kering kalus. Sedangkan pertumbuhan terendah terdapat pada eksplan yang ditanam pada medium MS dengan penambahan kinetin 1 ppm + 2,4-D 0,5 ppm pada kondisi terang pada umur 4 bulan (0,348 g).

#### **4.2. Kandungan Flavonoid dan Fenolik**

Produksi senyawa bioaktif pada kultur kalus telah banyak dilaporkan. Kultur kalus *Gardenia jasminoides* dilaporkan menghasilkan senyawa bioaktif (Salim *et al.*, 2019). Produksi medicarpin dilaporkan diproduksi oleh kalus *Dalbergia congestiflora* (Hernández-García *et al.*, 2021). Senyawa antikanker dari kultur kalus padi (Deshpande *et al.*, 2011). *Benzyl isothiocyanate production from Salvadora persica L. callus cultures* (Hegazi *et al.*, 2016). Kultur kalus *Alstonia scholaris* menghasilkan echitamine (Singh *et al.*, 2014). Kultur kalus dilaporkan memproduksi senyawa terapeutik (Benjamin, *et al.*, 2019). Kalus *Byrsonima verbascifolia* menghasilkan produksi senyawa fenolik (Castro *et al.*, 2016).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa semua kalus yang ditumbuhkan pada kondisi gelap maupun terang dapat memproduksi flavonoid dan fenolik tetapi dalam konsentrasi yang bervariasi (Gambar 4.8, 4.9, 4.10 dan 4.11). Konsentrasi ZPT dan pencahayaan memberikan pengaruh terhadap produksi flavonoid maupun fenolik pada kalus gembili. Pada Gambar 4.8 terlihat bahwa pada umur kalus 3 bulan, produksi flavonoid tertinggi diperoleh pada kombinasi ZPT kinetin 1 ppm dan 2,4-D 1 ppm kondisi terang dan produksi flavonoid terendah dihasilkan pada kalus yang dipelihara pada medium MS dengan penambahan kinetin 0,5 ppm dan 2,4-D 1 ppm kondisi gelap. Pada kondisi terang, kenaikan konsentrasi kinetin dan 2,4-D meningkatkan produksi flavonoid. Pada

kondisi gelap, konsentrasi kinetin yang lebih tinggi dari 2,4-D meningkatkan produksi flavonoid. Di Arabidopsis, sitokinin merupakan regulator positif untuk jalur biosintesis antosianin (salah satu jenis flavonoid) dan berfungsi dengan cara mengatur ekspresi gen *PAL1*, *CHI*, *CHS* and *DFR* pada biosintesis antosianin. Dua gen diatur oleh sitokinin pada tahap transkripsi dan dua gen diatur pada tahap post transkripsi (Deikman & Hammer, 1995). Kondisi pencahayaan juga mempengaruhi produksi flavonoid. Produksi flavonoid pada kalus yang dipelihara dalam gelap lebih rendah pada semua kombinasi perlakuan dibanding produksi kalus pada kondisi terang.



Gambar 4.8 Kandungan flavonoid dari kalus gembili umur 3 bulan yang dipelihara pada medium MS dengan penambahan 2,4-D dan kinetin pada terang dan gelap

#### Keterangan

K1 : Kinetin 0,5 ppm + 2,4-D 0,5 ppm

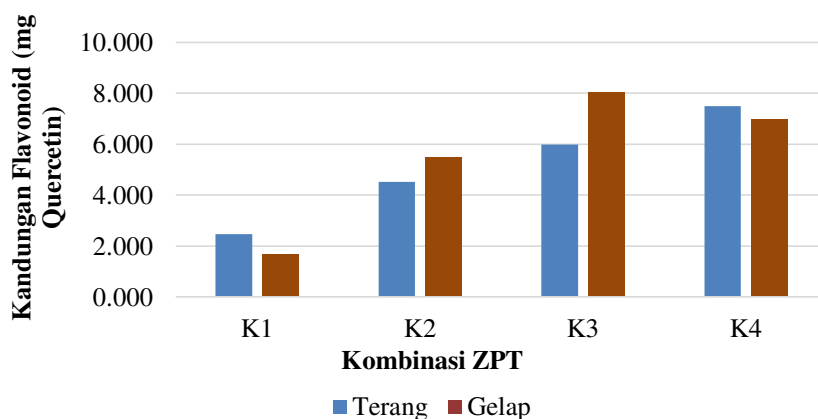
K2 : Kinetin 0,5 ppm + 2,4-D 1 ppm

K3 : Kinetin 1 ppm + 2,4-D 0,5 ppm

K4 : Kinetin 1 ppm + 2,4-D 1 ppm

Pada Gambar 4.9 terlihat bahwa pada umur kalus 4 bulan, produksi flavonoid tertinggi diperoleh pada kombinasi ZPT kinetin 1 ppm dan 2,4-D 0,5 ppm kondisi gelap. Kandungan flavonoid pada kalus umur 4 bulan sangat rendah dibandingkan dengan kalus umur 3 bulan. Hal ini

kemungkinan disebabkan karena sebagian besar sel telah mengalami kematian. Hal ini sejalan dengan data berat kering sel yang mengalami penurunan.



Gambar 4.9 Kandungan flavonoid dari kalus gembili umur 4 bulan yang dipelihara pada medium MS dengan penambahan 2,4-D dan kinetin pada terang dan gelap

#### Keterangan

K1 : Kinetin 0,5 ppm + 2,4-D 0,5 ppm

K2 : Kinetin 0,5 ppm + 2,4-D 1 ppm

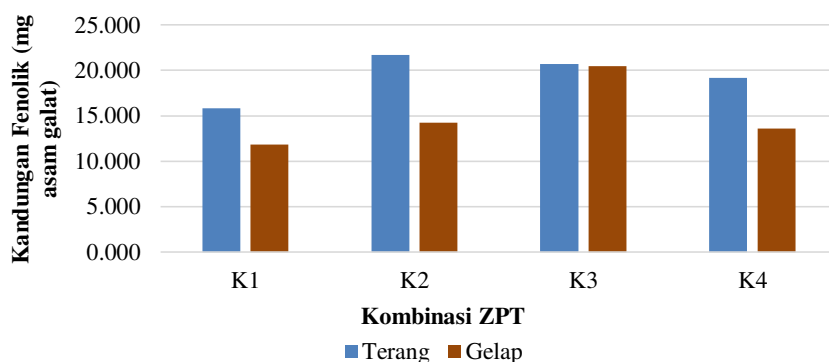
K3 : Kinetin 1 ppm + 2,4-D 0,5 ppm

K4 : Kinetin 1 ppm + 2,4-D 1 ppm

Berdasarkan pada parameter konsentrasi ZPT dan pencahayaan, maka kandungan flavonoid tertinggi diperoleh pada kalus umur 3 bulan yang dipelihara pada medium MS dengan penambahan kinetin 1 ppm dan 2,4-D 1 ppm kondisi terang. Hal ini menunjukkan bahwa pada kalus gembili, konsentrasi ZPT dan pencahayaan berpengaruh terhadap produksi flavonoid. Hal ini sesuai dengan penelitian Downey *et al.*, 2013 dan Lee *et al.*, 2011. Downey *et al.*, 2013 melaporkan bahwa konsentrasi NAA meningkatkan produksi isoflavonoid. Peningkatan metabolit sekunder akibat auksin dilaporkan juga pada kultur *Morus alba*. Pada kultur *Morus alba* penambahan IAA pada medium selain meningkatkan perkembangan kalus dan akar adventif juga meningkatkan kandungan rutin. Penambahan

5 mg/L IAA meningkatkan produksi rutin 87,5% selama 4 minggu pertama setelah kalus diinduksi (Lee *et al.*, 2011). Berdasarkan penelitian yang telah dilaporkan oleh Khan *et al.* (2018) dan Chen *et al.* (2019), cahaya mampu mempengaruhi produksi metabolit suatu tanaman dalam kultur jaringan, baik metabolit primer maupun metabolit sekunder.

Produksi fenolik pada kalus gambeli umur 3 bulan dapat dilihat pada Gambar 4.10. Pada kalus gambeli pola produksi fenolik hampir sejalan dengan pola produksi flavonoid. Pada kondisi terang, kalus menghasilkan fenolik lebih tinggi daripada kondisi gelap. Pada produksi fenolik kondisi terang, 2,4-D yang tinggi menghasilkan produksi paling tinggi. Pada kondisi gelap, sitokinin dengan konsentrasi yang tinggi menghasilkan produksi fenolik tertinggi. Hal ini sejalan dengan produksi flavonoid.



Gambar 4.10 Kandungan fenolik dari kalus gambeli umur 3 bulan yang dipelihara pada medium MS dengan penambahan 2,4-D dan kinetin pada kondisi terang dan gelap

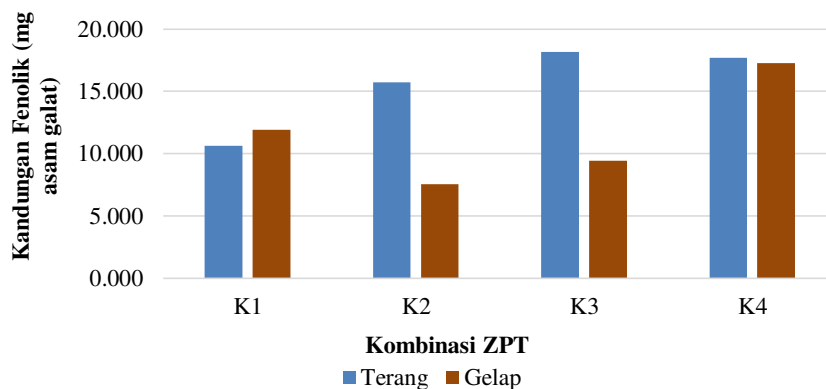
#### Keterangan

K1 : Kinetin 0,5 ppm + 2,4-D 0,5 ppm

K2 : Kinetin 0,5 ppm + 2,4-D 1 ppm

K3 : Kinetin 1 ppm + 2,4-D 0,5 ppm

K4 : Kinetin 1 ppm + 2,4-D 1 ppm



Gambar 4.11 Kandungan fenolik dari kalus gembili umur 4 bulan yang dipelihara pada medium MS dengan penambahan 2,4-D dan kinetin pada kondisi terang dan gelap

#### Keterangan

K1 : Kinetin 0,5 ppm + 2,4-D 0,5 ppm

K2 : Kinetin 0,5 ppm + 2,4-D 1 ppm

K3 : Kinetin 1 ppm + 2,4-D 0,5 ppm

K4 : Kinetin 1 ppm + 2,4-D 1 ppm

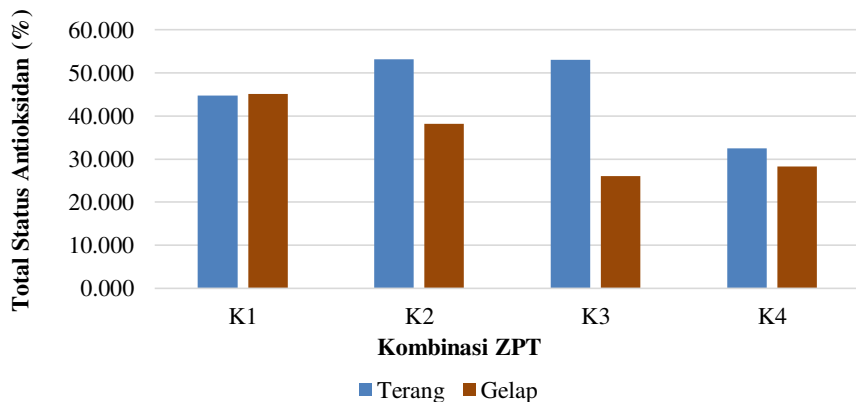
Produksi fenolik pada kalus gembili umur 3 bulan dan 4 bulan terlihat mempunyai pola yang sejalan, kalus pada kondisi terang menghasilkan fenolik lebih tinggi daripada kondisi gelap. Kandungan produksi fenolik tertinggi diperoleh pada kalus umur 3 bulan pada kombinasi medium kinetin 0,5 ppm + 2,4-D 1 ppm.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi ZPT dan pencahayaan berpengaruh terhadap produksi fenolik pada kalus gembili. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Chaabani et al., 2015 yang melaporkan bahwa kandungan fenolik pada kalus *Crataegus azarolus* yang dikultur pada medium MS dipengaruhi oleh ZPT. Pada kultur *Eucalyptus camaldulensis* cahaya meningkatkan kandungan senyawa fenolik (Arezki et al., 2001). Hal yang sama dilaporkan oleh Karimi et al. (2013), bahwa intensitas cahaya yang berbeda (310 dan 630  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) akan meningkatkan produksi metabolit sekunder seperti senyawa fenolik pada tanaman *Labisia pumila*. Bakhshi & Arakawa. (2006) pada *Malus*

*domestica*, asam fenolik, antosidanin dan flavonol bertambah secara cepat oleh adanya iradiasi. Menurut Kumari *et al.*, (2009), PHENYLALANINE AMMONIALYASE (PAL) yang merupakan enzim penting dalam biosintesis asam fenolik, akan meningkat aktivitasnya jika terinduksi oleh intensitas cahaya yang tinggi.

### 4.3. Aktivitas Antioksidan

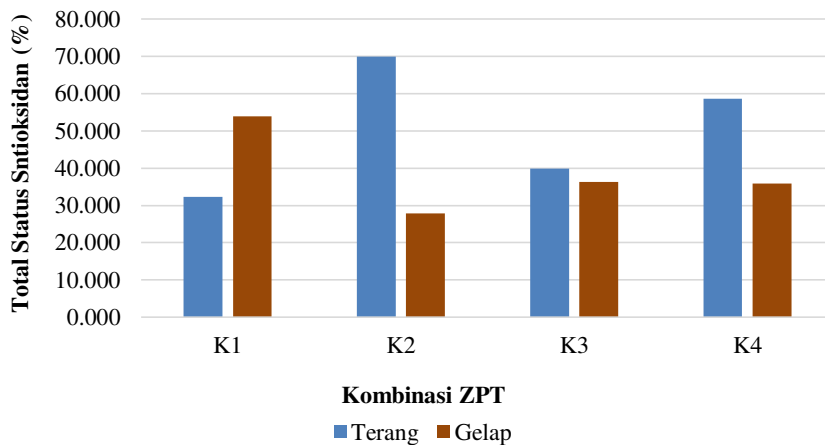
Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak kalus gembili dari semua perlakuan mempunyai aktivitas antioksidan dengan tingkat yang bervariasi. Aktivitas antioksidan pada kalus gembili dapat dilihat pada Gambar 4.12 dan 4.13. Pada gambar 4.12 dapat dilihat aktivitas antioksidan pada kalus gembili umur 3 bulan yang dipelihara pada medium MS dengan penambahan ZPT 2,4-D dan kinetin dalam kondisi terang.



Gambar 4.12 Aktivitas antioksidan kalus gembili umur 3 bulan yang dipelihara pada medium MS dengan penambahan 2,4-D dan kinetin pada kondisi terang dan gelap

#### Keterangan

- K1 : Kinetin 0,5 ppm + 2,4-D 0,5 ppm
- K2 : Kinetin 0,5 ppm + 2,4-D 1 ppm
- K3 : Kinetin 1 ppm + 2,4-D 0,5 ppm
- K4 : Kinetin 1 ppm + 2,4-D 1 ppm



Gambar 4.13 Aktivitas antioksidan kalus gambeli umur 4 bulan yang dipelihara pada medium MS dengan penambahan 2,4-D dan kinetin pada kondisi terang dan gelap

#### Keterangan

K1 : Kinetin 0,5 ppm + 2,4-D 0,5 ppm

K2 : Kinetin 0,5 ppm + 2,4-D 1 ppm

K3 : Kinetin 1 ppm + 2,4-D 0,5 ppm

K4 : Kinetin 1 ppm + 2,4-D 1 ppm

Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan tertinggi diperoleh pada kalus gambeli umur 4 yang dipelihara pada medium MS dengan penambahan Kinetin 0,5 ppm + 2,4-D 1 ppm pada kondisi terang. Pola aktivitas antioksidan dipengaruhi oleh ZPT dan pencahayaan. Pada kondisi terang, aktivitas antioksidan lebih tinggi daripada kondisi gelap.

Aktivitas antioksidan dari kultur kalus dilaporkan antara lain pada kalus *Cassia occidentalis*. Pada *Cassia occidentalis* potensi antioksidan pada kalus setara dengan antioksidan pada daun (Vats & Kamal, 2014). Aktivitas antioksidan juga dilaporkan pada kultur kalus *Vigna unguiculata* (Vats, 2012). Chaabani *et al.*, 2015 melaporkan bahwa aktivitas antioksidan ekstrak kalus *Crataegus azarolus* yang dikultur pada medium MS dengan penambahan 2 mg/L 2,4-D and 1 mg/L BAP mempunyai aktivitas antiradikal bebas terbesar (124 – 2.92 mg TE/g DM). Sehingga penggunaan 2,4-D yang lebih tinggi dari pada BAP cocok untuk



meningkatkan kualitas dibandingkan kuantitas senyawa bioaktif pada kultur kalus *Crataegus azarolus* (Chaabani *et al.*, 2015). Hal ini menunjukkan bahwa ZPT berpengaruh terhadap aktivitas antioksidan. Hal yang sama juga terlihat pada kalus gembili.

Hasil penelitian dapat dilihat bahwa kondisi optimal untuk pertumbuhan tidak sejalan dengan kondisi optimal yang diperlukan untuk produksi flavonoid, fenolik maupun aktivitas antioksidan. Pertumbuhan kalus gembili yang optimal memerlukan kondisi gelap. Produksi flavonoid, fenolik maupun aktivitas antioksidan yang optimal memerlukan pemeliharaan kalus dalam kondisi terang. Pencahayaan berpengaruh terhadap aktivitas kalus. Kombinasi ZPT juga berpengaruh terhadap pertumbuhan dan produksi metabolit kalus gembili.

Hal ini menunjukkan bahwa ZPT berpengaruh terhadap aktivitas antioksidan. Hal yang sama juga terlihat pada kalus gembili. Perbedaan aktivitas antioksidan disebabkan karena kalus mengandung flavonoid yang jumlah dan lokasi gugus hidroksinya pada kerangka flavonoid yang berbeda. Aktivitas antioksidan dari senyawa yang berasal dari tanaman seperti flavonoid disebabkan adanya gugus hidroksi pada struktur molekulnya. Flavonoid dengan gugus hidroksi bebas mempunyai aktivitas penangkap radikal dan adanya gugus hidroksi lebih dari satu terutama pada cincin B akan meningkatkan aktivitas antioksidannya

#### **4.4. Pembahasan secara umum**

Produksi metabolit sekunder menggunakan kultur *in vitro* telah banyak diaplikasi terutama pada negara-negara maju. Industri kosmetik dan obat menggunakan kultur *in vitro* untuk menghasilkan senyawa metabolit sekunder dari tumbuhan dengan mutu dan proses produksi yang terkendali. Kultur sel yang dipelihara dalam bioreaktor menjadi salah satu pilihan yang banyak digunakan. Banyak faktor yang mempengaruhi induksi kalus dan pertumbuhannya, antara lain tipe eksplan, kualitas dan tipe cahaya, kondisi fotoperiodisme, dan zat pengatur pertumbuhan (Pérez-Jiménez *et al.*, 2012). Telah dilakukan induksi kalus dari eksplan umbi gembili dengan menggunakan medium MS dengan penambahan 2,4-D dan kinetin dengan variasi konsentrasi dan kondisi pencahayaan terang dan gelap. Semua perlakuan dapat menginduksi terbentuknya kalus

meremah dengan warna berwarna kehijauan untuk kultur yang dipelihara dalam kondisi terang dan berwarna putih kekuningan untuk kalus yang dipelihara dalam kondisi gelap. Munculnya warna hijau pada kalus yang dipelihara dalam kondisi terang karena cahaya yang merupakan stimulus yang mampu memacu proses diferensiasi proplastid menjadi plastid yang mengandung klorofil, sehingga terbentuklah kalus yang berwarna hijau. Meskipun semua perlakuan menghasilkan kalus tetapi pertumbuhan kalus pada setiap perlakuan bervariasi. Pertumbuhan kalus yang ditunjukkan dengan berat kering menunjukkan hasil yang berbeda antar perlakuan. Pertumbuhan paling optimal dari keseluruhan perlakuan adalah kombinasi kinetin 0,5 ppm dan 2,4-D 0,5 ppm dalam kondisi gelap. Meskipun berat kering menunjukkan hasil yang bervariasi, hasil uji statistik menunjukkan bahwa baik perlakuan ZPT atau pencahayaan atau kombinasi keduanya tidak memberikan perbedaan yang signifikan terhadap pertumbuhan kalus.

Hasil analisis penelitian juga menunjukkan bahwa semua perlakuan menghasilkan kalus yang mengandung flavonoid, fenolik dan mempunyai aktivitas antioksidan dengan konsentrasi yang bervariasi. Ringkasan hasil uji statistik dapat dilihat pada Tabel 4.9-4.18 menunjukkan bahwa kombinasi perlakuan tidak selalu memberikan pengaruh terhadap Total Status Antioksidan, Flavonoid, dan Fenolik pada Kalus Gambeli.

Tabel 4.9 Perbandingan Total Status Antioksidan, Flavonoid, dan Fenolik pada Kalus Gambeli berdasarkan Pencahayaan.

Pencahayaan	Total status antioksidan			Flavonoid			Fenolik		
	Rata-rata	Sig.	Kesimpulan	Rata-rata	Sig.	Kesimpulan	Rata-rata	Sig.	Kesimpulan
Terang	46,516	0,077	Tidak ada pengaruh	23,997	0,000	Terdapat pengaruh	18,289	0,034	Terdapat pengaruh
Gelap	36,401			6,605			13,296		

Hasil uji statistik menunjukkan bahwa kondisi pencahayaan tidak berpengaruh secara signifikan terhadap status antioksidan tetapi berpengaruh secara signifikan terhadap kandungan flavonoid dan fenolik.

Tabel 4.10 Perbandingan Total Status Antioksidan, Flavonoid, dan Fenolik pada Kalus Gambili berdasarkan ZPT.

ZPT	Total status antioksidan			Flavonoid			Fenolik		
	Rata-rata	Sig.	Kesimpulan	Rata-rata	Sig.	Kesimpulan	Rata-rata	Sig.	Kesimpulan
K1D1	44,307	0,765	Tidak ada pengaruh	13,756	0,000	Terdapat pengaruh	13,766	0,291	Tidak ada pengaruh
K1D2	48,758			13,805			16,555		
K2D1	44,066			21,420			18,501		
K2D2	35,510			23,486			17,753		

Hasil uji statistik menunjukkan bahwa kombinasi ZPT tidak berpengaruh signifikan terhadap status antioksidan dan kandungan fenolik tetapi berpengaruh signifikan terhadap kandungan flavonoid.

Tabel 4.11 Perbandingan Total Status Antioksidan, Flavonoid, dan Fenolik pada Kalus Gambili berdasarkan Pencahayaan dan ZPT.

Pencahayaan	ZPT	Total status antioksidan			Flavonoid			Fenolik		
		Rata-rata	Sig.	Kesimpulan	Rata-rata	Sig.	Kesimpulan	Rata-rata	Sig.	Kesimpulan
TERANG	K1D1	41,898	0,222	Tidak ada pengaruh	19,169	0,211	Tidak ada pengaruh	14,642	0,679	Tidak ada pengaruh
	K1D2	58,193			20,020			19,940		
	K2D1	50,034			25,478			20,131		
	K2D2	38,632			30,404			18,822		
Gelap	K1D1	49,526			2,029			11,867		
	K1D2	33,033			3,445			10,911		
	K2D1	31,136			12,63			14,967		
	K2D2	31,911			8,496			15,438		

Berdasarkan hasil analisis statistik, kombinasi perlakuan (pencahayaan dan umur) dan ZPT tidak secara signifikan mempengaruhi total antioksidan, flavonoid, dan fenolik dari kalus Gambili. Hasil uji statistik juga menunjukkan bahwa kombinasi ZPT tidak berpengaruh signifikan terhadap status antioksidan dan kandungan fenolik tetapi berpengaruh signifikan terhadap kandungan flavonoid. Hal ini mengindikasikan bahwa pada kalus gambili, kandungan flavonoid dan fenolik bukan satu-satunya penentu aktivitas antioksidan. Jika dilihat berdasarkan pencahayaan dapat disimpulkan bahwa pencahayaan secara signifikan dapat mempengaruhi flavonoid dan fenolik. Pencahayaan terang cenderung akan menghasilkan nilai flavonoid dan fenolik yang tinggi, begitupun dengan total antioksidan walaupun perbedaan rata-ratanya tidak

terlalu signifikan. Umur secara signifikan mempengaruhi nilai dari flavonoid. Rata-rata nilai flavonoid dari kalus gembili berumur 3 bulan jauh lebih tinggi daripada kalus gembili berumur 4 bulan. Selain umur, ternyata ZPT juga secara signifikan mempengaruhi nilai dari flavonoid. Konsentrasi ZPT tinggi dan seimbang menghasilkan produksi flavonoid lebih tinggi. Produksi metabolit sekunder diatur oleh signal hormon. Interaksi antara zat pengatur tumbuh endogen dan eksogen akan mempengaruhi metabolisme sel. Zat pengatur tumbuh eksogen dapat mengubah akumulasi metabolit sekunder dengan mengatur ekspresi gen yang terlibat dalam sintesis metabolit sekunder. Zat pengatur tumbuh eksogen mengatur ekspresi gen pada tahapan transkripsi dengan mengatur faktor transkripsi gen yang memegang peranan penting dalam proses perkembangan tanaman termasuk sintesis metabolit sekunder (Zhao *et al.*, 2011, Rosa *et al.*, 2013). Kondisi optimal untuk pertumbuhan tidak sejalan dengan kondisi optimal yang diperlukan untuk produksi flavonoid, fenolik maupun aktivitas antioksidan.

Berdasarkan hasil penelitian ini maka dapat dilakukan strategi untuk produksi flavonoid, dan fenolik untuk kalus gembili. Strategi yang dapat dilakukan untuk produksi metabolit sekunder pada kultur gembili adalah melalui sistem 2 fase. Sistem 2 fase ini dapat memaksimalkan produksi metabolit sekunder (Malik *et al.*, 2012). Fase pertama adalah fase induksi dan perbanyakkan biomassa kalus yang dapat dilakukan pada medium MS dengan penambahan kombinasi ZPT kinetin 0,5 ppm + 2,4-D 0,5 ppm dan dalam kondisi gelap. Setelah biomassa sudah diperoleh dalam jumlah besar maka kalus dapat dipindah ke medium berikutnya yaitu medium untuk produksi flavonoid atau fenolik. Produksi flavonoid dan fenolik yang optimal tidak dapat dilakukan pada kondisi yang sama karena masing-masing memerlukan kondisi kultur yang berbeda. Produksi flavonoid dapat kita lakukan dengan menggunakan medium MS dengan penambahan kombinasi ZPT kinetin 1 ppm dan 2,4-D 1 ppm dan dipelihara pada kondisi terang. Proses produksi fenolik dapat kita lakukan dengan memindah kalus ke medium MS dengan penambahan kombinasi kinetin 0,5 ppm + 2,4-D 1 ppm dan dipelihara dalam kondisi terang. Pada fase kedua ini kita dapat melakukan upaya-upaya untuk peningkatan produksi metabolit sekunder misalnya dengan penambahan prekursor,

elisitasi, immobilisasi sel, induksi hairy root dengan menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* ataupun dengan induksi stress. Perlu dilakukan juga upaya untuk identifikasi jenis flavonoid dan fenolik yang dihasilkan oleh kalus gambeli sehingga pemberian perlakuan dapat lebih tepat. Jika jenis senyawa yang dihasilkan diketahui maka dapat diatur untuk pemberian precursor yang sesuai sehingga hasilnya lebih optimal. Selain itu adanya informasi mengenai jenis senyawa akan lebih menguntungkan secara ekonomi karena penggunaannya akan lebih optimal.

# BAB V

## SIMPULAN

Kalus yang dihasilkan dari umbi gembili dapat tumbuh pada medium MS dengan penambahan kombinasi kinetin dan 2,4-D. Kalus dari umbi gembili dapat menghasilkan flavonoid, fenolik dan mempunyai aktivitas antioksidan. Pencahayaan dan ZPT berpengaruh terhadap pertumbuhan kalus, kandungan flavonoid, fenolik dan aktivitas antioksidan. Kondisi terang menginduksi produksi flavonoid, fenolik dan aktivitas antioksidan lebih tinggi daripada kondisi gelap. Kondisi gelap merupakan kondisi yang paling baik untuk pertumbuhan kalus gembili. Konsentrasi dan komposisi ZPT mempengaruhi konsentrasi metabolit sekunder dan aktivitas antioksidan yang diproduksi kalus gembili.

Pertumbuhan kalus gembili paling optimal diinduksi pada eksplan yang dipelihara pada kombinasi ZPT kinetin 0,5 ppm dan 2,4-D 0,5 ppm kondisi gelap. Produksi flavonoid tertinggi diperoleh pada kombinasi ZPT kinetin 1 ppm dan 2,4-D 1 ppm kondisi terang. Kandungan produksi fenolik dan aktivitas antioksidan tertinggi diperoleh pada kalus yang tumbuh pada kombinasi medium kinetin 0,5 ppm + 2,4-D 1 ppm kondisi terang. Umur kalus gembili terbaik untuk dipanen adalah umur 3 bulan.

### **Saran :**

1. Perlu menggunakan sistem 2 fase untuk mendapatkan produksi senyawa bioaktif dari gembili secara optimal.
2. Perlu upaya meningkatkan produksi metabolit sekunder dengan menggunakan Teknik peningkatan produksi yang telah ada.
3. Perlu identifikasi jenis flavonoid dan fenolik yang terdapat dalam kalus umbi gembili.

## DAFTAR PUSTAKA

- Agati, G., Azzarello, E., Pollastri, S., Tattini, M. 2012. Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. *Plant Science*. 196:67–76
- Ahmad, N., Faisal, M., Anis, M., and Aref, I.M. 2010. In Vitro Callus Induction and Plant Regeneration from Leaf Explants of *Ruta graveolens* L. *S AFR J BOT*. 76(3):597–600
- Aloni, R. 2001. Foliar and Axial Aspects of Vascular Differentiation : Hypotheses and Evidence. *J Plant Growth Regul*. 20:22–34
- Aminah, N.S., Hidayah, R., & Tanjung, M. 2017. Confusarin And Nudol, Two Phenathrene Group Compounds, From *Dioscorea esculenta* L. And Their Antioxidant Acitivities. *Journal of Chemical Technology and Metallurgy*. 52(6):1135-1139
- Amoo, S.O., Aremu, A.O., and Staden, J.V. 2012. In Vitro Plant Regeneration, Secondary Metabolite Production and Antioxidant Activity of Micropropagated *Aloe arborescens* Mill. *Plant Cell Tiss Org*. 111:345–358
- Amoo, S.O. and Staden, J.V. 2012. Influence of Plant Growth Regulators on Shoot Proliferation and Secondary Metabolite Production in Micropropagated *Huernia hystrix*. *Plant Cell Tiss Org*. DOI10.1007/s11240-012-0230-x.
- Anggraini, T. 2017. *Sumber Antioksidan Alami*. Editor: Dr. Ir. Rina Yenrina MS. ISBN : 978-602-6506-54-2. Erka CV. Rumah kayu Pustaka Utama. Pp 78
- Arezki, O., Boxus, P., Kevers, C., and Gaspar, T. 2001. Changes in peroxidase activity, and level of phenolic compounds during light-induced plantlet regeneration from *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. nodes in vitro. *Plant Growth Regulation*. 33: 215–219

- Ashokhan, S., Ramasamy, S., Karsani, S.A., Othman, R., Yaacob, J.S. 2019. Analysis of bioactive pigments in coloured callus of *Azadirachta indica* for possible use as functional natural colourants. *Pigment & Resin Technology*. 48(1):9–19
- Asmila, Basri, B., Yusuf, R., & Hawalina. 2017. Callus Induction of *Cacao* Clone Sulawesi 1 On Various Concentrations Of 2,4 -D and Coconut Water Via In Vitro Culture. *Agroland. The Agriculture Science Journal*. 4(1):35-41
- Balasubramanya, S., Rajanna, L., and Anuradha, M. 2012. Effect of Plant Growth Regulators on Morphogenesis and Forskolol Production in *Plectranthus barbatus* Andrews. *In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant*. 48:208–215.
- Benjamin, E.D., Ishaku, G.A., Peingurta, F.A., & Afolabi, A.S. 2019. Callus Culture for the Production of Therapeutic Compounds. *American Journal of Plant Biology*. 4(4): 76-84
- Bonfill, M., Mangas, S., Moyano, E., Cusido, R.M., and Palazo, J. 2011. Production of Centellosides and Phytosterols in Cell Suspension Cultures of *Centella asiatica*. *Plant Cell Tiss Org*. 104:61–67. DOI 10.1007/s11240-010-9804-7
- Boonsongchee, P., Korsangruang, S., Soonthornchareonnon, N., Chintapakorn, Y., Saralamp, P., and Prathantururug, S. 2010. Growth and Isoflavonoid Accumulation of *Pueraria Candollei* Var. *Candollei* and *P.Candollei* Var. *Mirifica* Cell Suspension Cultures. *Plant Cell Tiss Org*. 101:119–126
- Campbell, N.A., Jane B. Reece, Lisa A. Urry, Michael L. Cain, Steven A. Wasserman, Peter V. Minorsky, and Robert B. Jackson. 2008. *Biology*. 8nd edition. Pearson Education, Inc. San Francisco. pp 738-821, 826-830
- Castro, A.H.F., Braga, K. Sousa, F.M., Coimbra, M.C., & Chagas, C.R. 2016. Callus Induction And Bioactive Phenolic Compounds Production from *Byrsonima verbascifolia* (L.) DC. (Malpighiaceae). *Revista Ciência Agronômica*. 47(1):143-151
- Cassidy, A., Reilly, E.J.O., Kay, C., Sampson, L., Franz, M., Forman, J.P., Curhan, G., and Rimm, E.B. 2011. Habitual Intake of Flavonoid



- Subclasses and Incident Hypertension in Adults. *Am J Clin Nutr.* 93:338–347
- Chawla, H.S. 2004. *Introduction to Plant Biotechnology*. 2nd Edt. Science Publishers, Inc. New Hampshire.
- Chaa<sup>^</sup>bani, G., Tabart, J., Kevers, C., Dommès, J., Khan, M.I., Zaoui, S., Chebchoub, L., Lachaa, M., Karray-Bouraoui, N. 2015. Effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic Acid Combined to 6-Benzylaminopurine on Callus Induction, Total Phenolic and Ascorbic Acid Production, and Antioxidant Activities in Leaf Tissue Cultures of *Crataegus azarolus* L. var. Aronia. *Acta Physiol Plant.* 37:16
- Chen, Y., Huang J., Hou, T.m & Pan, C. 2019. Effects Of Light Intensity And Plant Growth Regulators on Callus Proliferation And Shoot Regeneration in The Ornamental Succulent Haworthia. *Bot Stud.* 60:10 <https://doi.org/10.1186/s40529-019-0257-y>
- Cheynier, V. 2012. Phenolic Compounds: From Plants To Foods. *Phytochem Rev.* 11:153–177.
- Cortleven, A., Marg, I., Yamburenko, M.V., Schlicke, H., Hill, K., Grimm, B., Schaller, G.E., Schmulling, T. 2016. Cytokinin Regulates the Etioplast-Chloroplast Transition through the Two-Component Signaling System and Activation of Chloroplast-Related Genes. *Plant Physiology.* 172:464–478
- Downey, P.J., Levine, L.H., Musgrave, M.E., Keon-Bennett, M., and Moane, S. 2013. Effect of Hypergravity and Phytohormones on Isoflavonoid Accumulation in Soybean (*Glycine max.* L.) Callus. *Microgravity Sci. Technol.* 25:9–15
- Deshpande, A., Dhadi, S.R., Hager, E.J., & Ramakrishna, W. 2011. Anticancer Activity of Rice Callus Suspension Culture. *Phytother. Res. Rice Science.* 28(1):13-30
- Dodds, L.H., L.W. Roberts, 1982. *Experiment in Plant Tissue Culture*. Cambridge University Press. London. 178 p.
- Faramayuda, F., & Ramelan, R. S. 2016. Optimasi Induksi Kalus Tanaman Cabe Jawa (*Piper retrofractum* Vahl) dengan Berbagai Variasi Zat Pengatur Tumbuh. *Kartika. Jurnal Ilmiah Farmasi.* 4(2), 21-25.

- Fauziah & Mas'udah, S. 2015. Explorations Diversity Of *Dioscorea* spp. Varieties From Pasuruan, East Java: Inventory And Characterization. *Agrivita*. 37 (3) : 193-203
- Ferreira, M.F., Rius, S.P., and Casati, P. 2012. Flavonoids : Biosynthesis, Biological Functions, and Biotechnological Applications. *Plant Sci*. 3(222) : 1-15
- Figueiredo, S.F.L., Albarello, N., and Viana, V.R.C. 2000. *Rollinia mucosa* Cell Suspension Cultures : Establishment and Growth Conditions. *Plant Cell Tiss Org*. 63: 85–92
- Fotso, F., Sandrine, N. N. M. F., Désiré, M. H., François, D. P., & Denis, O. N. 2013. Micropropagation of *Dioscorea alata* L. from Microtubers Induced *in vitro*. *African Journal of Biotechnology*, 12(10): 1057-1067.
- Gaspar, T., Kevers, C., Penel, C., Greppin, H., Reid, D. M., & Thorpe, T. A. 1996. Plant Hormones and Plant Growth Regulators in Plant Tissue Culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 32(4): 272-289.
- Gadzovska, S., Maury, S.P., Delaunay, A., Spasenoski, M., Hagege, D., Courtois, D., and Joseph, C. 2012. The Influence of Salicylic Acid Elicitation of Shoots, Callus, and Cell Suspension Cultures on Production of Naphtodianthrones and Phenyl Propanoids in *Hypericum perforatum* L. *Plant Cell Tiss Org*. DOI10.1007/s11240-012-0248-0
- Gurel, E., Yucesan, B., Aglic, E., Gurel, S., Verma, S.K., Sokmen, M., and Sokmen, A. 2011. Regeneration and Cardiotonic Glycoside Production in *Digitalis davisiana* Heywood (Alanya Foxglove). *Plant Cell Tiss Org*. 104:217–225
- Hapsoro, D., & Yusnita. 2018. *Kultur Jaringan : Teori dan Praktek*. Penerbit Andi. Pp 167
- Habibah, N.A., Moeljopawiro, S., Dewi, K., and Indrianto, A. 2016. Flavonoid Production in Callus Cultures from Mesocarp of *Stelechocarpus burahol*. *Biosaintifika*. 8 (2) 214-22
- Habibah, N.A., Moeljopawiro, S., Dewi, K., and Indrianto, A. 2018. Callus Induction And Flavonoid Production On The Immature

- Seed of *Stelechocarpus burahol*. *Journal of Physics: Conf. Series* 983 012186. doi :10.1088/1742-6596/983/1/012186
- Habibah, N.A., Widiatningrum, T., Anggraito, Y.U., Rahayu, E.S., Mukhtar, K., Wijawati, N., & Musafa, R. 2019. Growth of *Elaeocarpus grandiflorus* Callus Cultures In MS Medium With Various Concentrations Of Growth Regulators. *Journal of Physics: Conference Series* 1321 032037 IOP Publishing doi:10.1088/1742-6596/1321/3/032037
- Habibah, N.A., Nugrahaningsih, W.H., Musafa, F., Rostriana, R., Mukhtar, K., Wijawati, N., & Anggraito, Y.U. 2020. Bioactive Compounds From Callus Culture of *Elaeocarpus grandiflorus*. *Journal of Physics: Conference Series* 1567 032055 IOP Publishing doi:10.1088/1742-6596/1567/3/032055
- Habibah, N.A., Safitri, S., Pratiwi, Y.R., Wijawati, N., Musafa, F., Puspitasari, A.D.S., and Yuniastuti, A. 2021. Callus Induction from Tuber of Lesser Yam (*Dioscorea esculenta*) on MS media supplemented by 2,4-D and kinetin. *Journal of Physics: Conference Series* 1918. 052029
- Hernández-García, A., C. Velázquez-Becerra, R. Herrera-Bucio, J.J. García-Magaña, P. López-Albarrán and E. Ambriz. 2021. Establishment of Callus and Cell Suspensions Cultures of *Dalbergia congestiflora* (Fabaceae) to (+)-medicarpin production. *Asian J. Plant Sci.* 20: 109-115
- Hegazi, G.A., El-Hanafy, N.A., Abu-Elkheir, Z.A., & Hussein, I.A. 2016. Benzyl isothiocyanate production from *Salvadora persica* L. callus cultures. *IOSR Journal of Biotechnology and Biochemistry* (IOSR-JBB). 2(2):19-25
- Herlina, H., Harijono, H., Subagio, A., & Estiasih, T. 2013. Potensi Hipolipidemik Polisakarida Larut Air Umbi Gembili (*Dioscorea esculenta* L.) pada Tikus Hiperlipidemia. *Agritech.* 33 (1). <https://doi.org/10.22146/agritech.9561>
- Inz'e, D. and Veylder, LD. 2006. Cell Cycle Regulation in Plant Development1 *Annu. Rev. Genet.* 40:77-105

- Ikenaga, T., Handayani, R., and Oyama, T. 2000. Steroidal Saponin Production in Callus Cultures of *Solanum aculeatissimum* Jacq. *Plant Cell Rep.* 19:1240–1244
- Ikeuchi, M., Sugimoto, K., and Iwase, A. 2013. Plant Callus: Mechanisms of Induction and Repression. *The Plant Cell.* 25: 3159–3173
- Jain, R., Sinha, A., Jain, D., Kachhwaha, S., and Kothari, S.L. 2011. Adventitious Shoot Regeneration and In Vitro Biosynthesis of Steroidal Lactonesin *Withania coagulans* (Stocks) Dunal. *Plant Cell Tiss Org.* 105:135–140
- Karimi, E., Jaafar, H.Z.E., Ghasemzadeh, A., and Ibrahim, M.H. 2013. Light Intensity Effects on Production and Antioxidant Activity of Flavonoids and Phenolic Compounds in Leaves, Stems and Roots of Three Varieties of *Labisia pumila* Benth. *AJCS.* 7(7):1016-1023
- Keul, A.L.B., Vlase, L., and Crăciunaș, C. 2012. Clonal Propagation and Production of Cichoric Acid in Three Species of Echinaceae. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* —Plant 48:249–258
- Khasanah, Y., Nurhayati, R., Miftakhussholihah, Btari, S., & Ratnaningrum, E. 2019. Isolation oligosaccharides from gembili (*Dioscorea esculenta* Lour. Burkill) as prebiotics. *IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering.* **633** 012006
- Khalilueva, M.R., Bogoutdinovaa, L.R., Baranova, G.B., Baranovaa, E.N., Kharchenkoa, P.N., & Dogova, S.V. 2014. Influence of Genotype, Explant Type, and Component of Culture Medium on in vitro Callus Induction and Shoot Organogenesis of Tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Biology Bulletin.* 41(6) : 512–521
- Khan, I., Khan, S.R.S., Farooq, M., Alam, N., Zaman, M.S., Rahman, A.M., Qayum, A., & Khan, A.A. 2018. Effect of Various Plant Growth Regulators and Light Intensity (Complete And Diffused Light) On The Callus Proliferation Of The Carraluma Plant. *European Academic Research.* VI (8)
- Khan, M.F., Negi, N., and Negi, D.S. 2013. Bioactive Flavanoids from *Glycosmis arborea*. *Org Med Chem Lett.* 3:4
- Kherasani, I., Prihastanti, E., & Haryanti, S. 2017. Pertumbuhan Kalus Eksplan Rimpang Jahe Merah (*Zingiber officinale* Rosc.) pada

- Berbagai Konsentrasi Sukrosa Secara *In Vitro*. *Buletin Anatomi dan Fisiologi*. 2(1) : 43-49.
- Kurniawan, A. D., & Widoretno, W. 2016. Regenerasi In Vitro Tanaman Bawang Merah (*Allium ascalonicum* L.). *Biotropika: Journal of Tropical Biology*, 4(1): 1-4.
- Kumar, G.P., Subiramanim S., Govindarajan, S., Sadasivam , V., Manickam, V., Mogilicherla, K., Thiruppathi, S.K., and Narayanasamy, J. 2015. Evaluation of Different Carbon Sources for High Frequency Callus Culture with Reduced Phenolic Secretion in Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) cv.SVPR-2. *Biotechol. Rep.* 7:72–80
- Kumar, M.S., Chaudhury, S., and Balachandran, S. 2010. In Vitro Callus Culture of *Heliotropium indicum* Linn. for Assessment of Total Phenolic and Flavonoid Content and Antioxidant Activity. *Appl Biochem Biotechnol* DOI10.1007/s12010-014-1235-1
- Kumari R., Singh S., and Agrawal S.B. 2009. Effects of Supplemental Ultraviolet-B Radiation on Growth and Physiology of *Acorus calamus* L. (sweet flag). *Acta Biol Cracov Ser Bot* 51: 19–27
- Kumar, V., Desai, D., and Shriram, V. 2014. Hairy Root Induction in *Helicteres isora* L. and Production of Diosgenin in Hairy Roots. *Nat. Prod. Bioprospect.* DOI10.1007/s13659-014-0011-9. 2014.
- Lata, A.J.M., Dalei, J., & Sahoo, D. 2014. Effect of Different Growth Regulators On Invitro Callus Culture of *Artemisia absinthium* and Genetic Transformation by *Agrobacterium* Mediated Gene Transfer. *International Journal of Multidisciplinary Research and Development*. 1(6): 25-28
- Lakshmi, B.J. and Reddy, K.J. 2012. In Vitro Studies In Dikamali Gum (*Gardenia resinifera* Roth.) - A Medicinally Important Plant. *Indian J.Sci.Res.*3(1) : 81-86
- Lee, H.J., Watanabe, B., Nakayasu, M., Onjo, M., Sugimoto, Y., & Mizutani, M. 2017. Novel steroidal saponins from *Dioscorea esculenta* (Togedokoro). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 81(12) : 2253–2260
- Lee, Y., Lee., D.E., Lee H.S., Kim, S.K., Lee, W.S., Kim, S.H., and Kim M.W. 2011. Influence of Auxins, Cytokinins, and Nitrogen on

- Production of Rutin from Callus and Adventitious Roots of the White Mulberry Tree (*Morus alba* L.). *Plant Cell Tiss Org.* 105:9–19
- Lewis, D.R., Ramirez, M.V., Miller, N.D., Vallabhaneni, P., Ray, W.K., Helm, R.F., Winkel, B.S.J., and Muday, G.K. 2011. Auxin and Ethylene Induce Flavonol Accumulation through Distinct Transcriptional Networks. *Plant Physiol.* 156(1): 144–164.
- Liu, N., Zeller, F.J., and Chen, Q.F. 2013. The flavonoid Content in Leaves and Inflorescences of the Wild Perennial *Fagopyrum cymosum* complex. *Genet Resour Crop Evol* 60:825–838
- Lystvan, K., Belokurova, V., Sheludko, Y., Ingham, J., Prykhodko, V., Kishchenko, O., Paton, E., and Kuchuk, M. Production of Bakuchiol by In Vitro Systems of *Psoralea drupacea* Bge. 2010. *Plant Cell Tiss Org.* 101:99–103
- Manoharan, R., Tripathi, J. N., & Tripathi, L. 2016. Plant Regeneration from Axillary Bud Derived Callus in White Yam (*Dioscorea rotundata*). *Plant Cell Tiss Org.* 126(3): 481-497.
- Malik, S., Hossein Mirjalili, M., Fett-Neto, A. G., Mazzafera, P., & Bonfill, M. 2012. *Living between two worlds: two-phase culture systems for producing plant secondary metabolites. Critical Reviews in Biotechnology.* 33(1):1–22
- Misra, B.B. and Dey, S. 2013. Developmental Variations in Sesquiterpenoid Biosynthesis in East Indian Sandal Wood Tree (*Santalum album* L.). *Trees.* 27:1071–1086
- Molchan, O., Romashko, S., and Yurin, V. 2012. L-tryptophan Decarboxylase Activity and Tryptamine Accumulation in Callus Cultures of *Vinca minor* L. *Plant Cell Tiss Org.* 108:535–539
- Mereu, A.R., Kriaa, D., & Scarpa, G.M. 2019. In Vitro Culture Of Saffron: Hormones Influence On The Development Of New Shoots And Callus. *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology.* 20(11&12):511–520
- Nuryana, I. 2018. Keragaman Jamur Mikoriza Arbuskular (JMA) dalam Akar Tanaman Gambili (*Dioscorea esculenta*) yang Tumbuh di Ketinggian Tempat Berbeda. *Biotrends.* 9(1): 43-46.

- Petrussa, E., Braidot, E., Zancani, M., Peresson, C., Bertolini, A., Patui, S., and Vianello, A. 2013. Plant Flavonoids—Biosynthesis, Transport and Involvement in Stress Responses. *Int. J. Mol. Sci.* 14 :14950-14973
- Pereira, P.A., Sousa, F.V., and Becker, J.D. 2012. Decision-Making in the Plant Cell Cycle. *canalBQ*. 9:48-62
- Purwantiningsih, Hakim, A.R., and Purwantini, I. 2010. Antihyperuricemic Activity Of The Kepek [ *Stelechocarpus bura hol* (Bl.) Hook. F. & Th.] Leaves Extract and Xanthine Oxidase Inhibitory Study. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2(2): 123–127
- Ptak, A., Tahchy, A.E., Zgolik, G.W., Henry, M., and Mattar, D.L. 2010. Effects of Ethylene on Somatic Embryogenesis and Galanthamine Content in *Leuco jumaestivum* L.cultures. *Plant Cell Tiss Org.* 102:61–67
- Prabowo AY, Estiasih, T, Purwantiningrum I. 2014. Umbi Gembili (*Dioscorea esculenta* L.) Sebagai Bahan Pangan Mengandung Senyawa Bioaktif : Kajian Pustaka. *Jurnal Pangan dan Agroindustri.* 2(3):129 –135
- Poornima, G. N., & Ravishankar, R. V. 2007. *In vitro* Propagation of Wild Yams, *Dioscorea oppositifolia* (Linn) and *Dioscorea pentaphylla* (Linn). *African Journal of Biotechnology.* 6(20): 2349-2352
- Ram, M., Prasad, K.V., Singh, S.K., Hada, B.S., & Kumar, S. 2013. Influence of salicylic acid and methyl jasmonate elicitation on anthocyanin production in Callus Cultures of *Rosa hybrida* L. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 113:459–467
- Retnowati, D.S., Kumoro, A.C., & Ratnawati, R. 2018. Physical, Thermal and Functional Properties of Flour Derived from Ubi Gembili (*Dioscorea esculenta* L.) Tubers Grown in Indonesia. *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences.* 12(1): 539-545.
- Rimbawan & Nurbayani, R. 2013. Nilai Indeks Glikemik Produk Olahan Gembili (*Dioscorea esculenta*). *Jurnal Gizi dan Pangan.* 8(2): 145—150.
- Roef, L., and H. Van Onckelen, H.V. 2007. *Cytokinin Regulation of the Cell Division Cycle in Plant Hormones Biosynthesis, Signal Transduction, Action.* Ed. Davies, P.J. Springer. 241-261.

- Rosa L.S., Silva N.J.A, Soares N.C.P., Monteiro M.C., Teodoro A.J. 2016. Anticancer Properties of Phenolic Acids in Colon Cancer – A Review. *J Nutr Food Sci.* 6(2): 468. doi:10.4172/2155-9600.1000468
- Rosa, Y.B.C.J., Aizza, L.B.C., Bello, C.C.M., and Dornellas, M.C. 2013. The Pm NAC1 Gene is Induced by Auxin and Expressed in Differentiating Vascular Cells in Callus Cultures of *Passiflora*. *Plant Cell Tiss Org.* DOI10.1007/s11240-013-0360-9
- Rudiyanto, R., Wulandari, D. R., & Ermayanti, T. M. 2019. Induksi Kalus Uwi Ungu (*Dioscorea alata* L.) pada Media MS dengan Penambahan BAP yang Dikombinasikan dengan 2, 4-D. *Prosiding Seminar Nasional Agroteknologi.* 1: 112-121.
- Taiz, L. and Zeiger, E. 2010. *Plant Physiology*. Sinauer Associates, Inc. Massachusetts. Pp 545-582
- Tang, W. and Newton, R.J. 2004. Increase of Polyphenol Oxidase and Decrease of Polyamines Correlate with Tissue Browning in Virginia Pine (*Pinus virginiana* Mill.). *Plant Sci.* 167: 621–628
- Tripathi, P.K., Wasthi, S., Kanojiya, S., Tripathi, V., Mishra, D.K. 2013. Callus Culture and In Vitro Biosynthesis of Cardiac Glycosides from *Calotropis gigantea*. *In Vitro Cell.Dev.Biol-Plant.* 49(4):455-60.
- Sabda, M., Wulanningtyas, H.C., Ondikeleuw, M., & Baliadi, Y. 2019. Karakterisasi Potensi Gembili (*Dioscorea esculenta* L.) Lokal Asal Papua Sebagai Alternatif Bahan Pangan Pokok. *Bul. Plasma Nufah.* 25(1):25–32
- Saikia, M., Shrivastava, K., & Singh, S.S. 2013. Effect of Culture Media and Growth Hormones on Callus Induction in *Aquilaria malaccensis* Lam., a Medicinally and Commercially Important Tree Species of Nort East India. *Asian Journal of Biological Sciences.* 6(2):96-105
- Salim, S.A., Hamza, S.Y., & Habeeb, M.S. 2019. Enhancement Of *Gardenia jasminoides* Ellis Friable Callus Growth And Its Constituents Of Some Bioactive Compounds. *Plant Archives.* 19 (2): 398-402



- Samy, B.G., Jegatheesan, K., & Francina, C.I. 2017. In-Vitro Propagation of *Dioscorea alata* for Tyrosinase Production. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*. 5(2): 85-88.
- Setiawati, T., Arofah, A. N., & Nurzaman, M. 2020. Induksi Kalus Krisan (*Chrysanthemum morifolium* Ramat var. Tomohon Kuning) dengan 2, 4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2, 4-D) dan 6-Benzylaminopurine (BAP) pada Kondisi Pencahayaan Berbeda. *Pro-Life*. 7(1): 13-26.
- Senanayake, S.A., Ranaweera K.K.D.S, Bamunuarachchi, A., & Gunaratne, A. 2012. Proximate Analysis And Phytochemical And Mineral Constituents In Four Cultivars Of Yams And Tuber Crops In Sri Lanka. *Tropical Agricultural Research & Extension* 15(1):32-36
- Shah, H. J., & Lele, S. S. 2012. In vitro Propagation of *Dioscorea alata* var. *purpurea*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 167(6): 1811-1817
- Shajeela, P.S., Mohan, V.R., Jesudas, L.L., & Soris, P.T. 2011. Nutritional and antinutritional evaluation of wild yam (*Dioscorea* spp.). *Tropical and subtropical agroecosystems*. 14 (2):723-730
- Singh, S.K., Joshi, T., Kanojiya, S., Tripathi, V., Mishra, D.K. 2014. Callus culture and in vitro biosynthesis of echitamine from *Alstonia scholaris* (L.) R. Br. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. DOI 10.1007/s11240-014-0579-0.
- Siregar, L.A.M., Keng, C.L., dan Lim, B.P. 2006. Pertumbuhan dan Akumulasi Alkaloid dalam Kalus dan Suspensi Sel *Eurycoma longifolia* Jack. *Jurnal Ilmiah Pertanian KULTURA*. 41(1):19-27
- Soto-Vaca A, Gutierrez A, Losso J.N., Xu Z and Finley J.W. 2012. Evolution of Phenolic Compounds from Color and Flavor Problems to Health Benefits. *J Agric Food Chem*. 60:6658–6677
- Okwu, D.E and C.U. Ndu , 2006. Evaluation of the Phytonutrients, Mineral and Vitamin Contents of Some Varieties of Yam (*Dioscorea* sp.). *International Journal of Molecular Medicine and Advance Sciences*. 2: 199-203

- Vats S. 2012. Antioxidant Activity of Callus Culture of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. *Researcher*. 4(6):22-24.
- Vats, S., & Kamal, R. 2014. Flavonoids and Antioxidant Activity of Different Plant Parts and Callus Culture of *Cassia occidentalis* L. *Current Bioactive Compounds*. 10:201-206
- Vanisree, M., Lee, C. Y., Lo, S. F., Nalawade, S. M., Lin, C. Y., & Tsay, H. S. 2004. Studies on The Production of Some Important Secondary Metabolites from Medicinal Plants by Plant Tissue Cultures. *Boanical Buletin of Academia Sinica*, 45(1): 1-22.
- Veraplakorn, V. 2016. Micropropagation and Callus Induction of *Lantana camara* L. A Medicinal Plant. *Agriculture and Natural Resources*. 50:338-344
- Yuniastuti, A., & Iswari, R.S. 2019. Isolation and Identification of Inulin and Fos from *Dioscorea Esculenta*. *UNNES International Conference on Research Innovation and Commercialization 2018*. KnE Social Sciences. 41–46. DOI 10.18502/kss.v3i18.4696
- Yücesan, B., Müller-Uri, F., Kreis, W., and Gürel, E. 2014. Cardenolide Estimation in Callus-Mediated Regenerants of *Ivanina* (dwarf foxglove). *In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant*. 50:137–142
- Zhao, S., Sun, H., Gao, Y., Sui, N., and Wang B. 2011. Growth Regulator-Induced Betacyanin Accumulation and Dopa-4,5-dioxygenase (DODA) Gene Expression in Euhalophyte *Suaeda salsa* Calli. *In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant*. 47:391–398
- Zhao, L., Gao, L., Wang, H., Chen, X., Wang, Y., Yang, H., Wei, C., Wan, X., and Xia, T. 2013. The R2R3-MYB, bHLH, WD40, and Related Transcription Factors in Flavonoid Biosynthesis. *Funct Integr Genomics*. 13:75–98
- Wibawa, I.P.A.H, Kurniawan, A., & Adjie, B. 2011. Studi Keragaman Jenis, Kandungan Gizi Esensial Dan Kalsium Oksalat *Dioscorea* Di Pulau Bali Dan Lombok. *Buletin Kebun Raya*. 14(2):1-8

# GLOSARIUM

2,4-D: 2,4 Dichlorophenoxyacetic acid, zat pengatur tumbuh auksin, termasuk auksin kuat yang sering digunakan untuk induksi kalus

Antioksidan: adalah senyawa yang mampu melindungi tubuh dari serangan radikal bebas yang bersifat toksik.

Autoklaf: alat yang digunakan untuk sterilisasi alat diseksi, media kultur dan alat gelas dengan cara menggunakan tekanan dan suhu uap air yang tinggi

Dediferensiasi: suatu proses perubahan sel atau kumpulan sel dari mempunyai sifat sebagai bagian dari organ ataupun jaringan menjadi sel atau kumpulan sel dengan sifat yang tidak akan berkembang menjadi organ atau jaringan tertentu.

Diferensiasi: suatu proses perubahan sel atau kumpulan sel dengan sifat tidak berkembang menjadi jaringan atau organ tertentu menjadi sel atau kumpulan sel yang tumbuh dan berkembang menjadi jaringan atau organ tertentu

Eksplan: bagian tumbuhan yang digunakan sebagai bahan untuk kultur in vitro

Fenolik: merupakan senyawa yang mengandung cincin aromatik terhidrosilasi, kelompok hidroksi yang melekat langsung ke fenil, fenil pengganti, atau kelompok aril lainnya. Fenolik banyak dihasilkan oleh tumbuhan dan dihasilkan melalui jalur asam sikimat dan fenilpropanoid.

Flavonoid: merupakan metabolit sekunder yang mempunyai kemampuan bioaktif yang diproduksi oleh tumbuhan dan ditemukan pada berbagai bagian tumbuhan. Flavonoid mengandung molekul

aromatik yang berasal dari Phenilalanin dan malonyl-coenzymeA (CoA melalui jalur asam lemak)

*in vitro*: dalam tabung, kultur *in vitro* artinya tanaman/bagian tanaman ditumbuhkan pada wadah kultur dalam kondisi aseptik dan lingkungan terkontrol di dalam ruang kultur.

Kalus: massa sel yang belum terdiferensiasi yang terbentuk dari sel-sel yang membelah terus menerus secara *in vitro* atau di dalam tabung.

Kinetin: Kinetin tergolong dalam jenis hormon sitokinin yang berperan merangsang pembelahan sel.

*Laminar Air Flow* (LAF): tempat untuk bekerja secara *aseptic*, biasanya dilengkapi dengan filter udara dan UV.

Medium Murashige & Skoog (1962): Medium kultur jaringan tumbuhan yang diformulasikan oleh Murashige & Skoog pada tahun 1962. Medium Murashige dan Skoog merupakan medium yang paling banyak digunakan untuk sebagian besar spesies tanaman termasuk dikotil maupun monokotil.

Totipotensi sel: kemampuan setiap sel tumbuhan untuk tumbuh dan berkembang membentuk tumbuhan baru yang utuh serta mampu membentuk senyawa metabolit primer dan sekunder seperti tanaman induknya bila dipelihara pada kondisi yang tepat.

Zat Pengatur Tumbuh: Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) adalah zat bukan hara alami ataupun sintetik yang dalam konsentrasi rendah mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan bagian tanaman atau tanaman secara utuh, baik *ex vitro* maupun *in vitro*.



# PRODUKSI SENYAWA BIOAKTIF DARI KULTUR KALUS GEMBILI (*Dioscorea Esculenta*)

"Kalus yang dihasilkan dari umbi gembili dapat tumbuh pada medium MS dengan penambahan kombinasi kinetin dan 2,4-D. Kalus dari umbi gembili dapat menghasilkan flavonoid, fenolik dan mempunyai aktivitas antioksidan."

**Penerbit Deepublish (CV BUDI UTAMA)**

Jl. Kaliurang Km 9,3 Yogyakarta 55581

Telp/Fax : (0274) 4533427

Anggota IKAPI (076/DIY/2012)

✉ cs@deepublish.co.id

📍 Penerbit Deepublish

📧 @penerbitbuku\_deepublish

🌐 www.penerbitdeepublish.com



Kategori : Biologi

ISBN 978-623-02-3362-3



9

786230

233623