

**PENINGKATAN KANDUNGAN FLAVONOID KALUS DELIMA HITAM
(*Punica granatum* L.) DENGAN PENAMBAHAN *POLYETHYLENE
GLYCOL* (PEG) 6000 MELALUI TEKNIK *IN VITRO***

SKRIPSI

Oleh:

UMI SA'DIYAH

NIM. 15620001



JURUSAN BIOLOGI

FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI

UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM

MALANG

2019

**PENINGKATAN KANDUNGAN FLAVONOID KALUS DELIMA HITAM
(*Punica granatum* L.) DENGAN PENAMBAHAN *POLYETHYLENE
GLYCOL* (PEG) 6000 MELALUI TEKNIK *IN VITRO***

SKRIPSI

Oleh:

UMI SA'DIYAH

NIM. 15620001



JURUSAN BIOLOGI

FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI

UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM

MALANG

2019

**PENINGKATAN KANDUNGAN FLAVONOID KALUS DELIMA HITAM
(*Punica granatum* L.) DENGAN PENAMBAHAN *POLYETHYLENE
GLYCOL* (PEG) 6000 MELALUI TEKNIK *IN VITRO***

Diajukan Kepada:

Fakultas Sains dan Teknologi

Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang

untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan dalam

Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)

Oleh:

UMI SA'DIYAH

NIM. 15620001

SKRIPSI

JURUSAN BIOLOGI

FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI

UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM

MALANG

2019

**PENINGKATAN KANDUNGAN FLAVONOID KALUS DELIMA HITAM
(*Punica granatum* L.) DENGAN PENAMBAHAN *POLYETHYLENE
GLICOL* (PEG) 6000 MELALUI TEKNIK *IN VITRO***

SKRIPSI

Oleh:
UMI SA'DIYAH
NIM. 15620001

Telah Diperiksa dan Disetujui oleh:
Tanggal: 12 Desember 2019

Pembimbing I

Ruri Siti Resmisari, M.Si
NIP. 19790123 2016 0801 2 063

Pembimbing II

M. Mukhlis Fahrudin, M.S.I
NIPT. 20142011409



Mengetahui,
Ketua Jurusan Biologi

Romaidi, M.Si., D.Sc
NIP. 19810201 200901 1 019

**PENINGKATAN KANDUNGAN FLAVONOID KALUS DELIMA HITAM
(*Punica granatum* L.) DENGAN PENAMBAHAN *POLYETHYLENE
GLICOL* (PEG) 6000 MELALUI TEKNIK *IN VITRO***

SKRIPSI

Oleh:

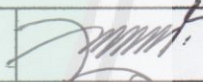

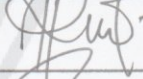
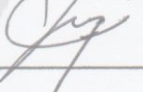
UMI SA'DIYAH

NIM. 15620001

Telah dipertahankan

di depan Dewan Penguji Skripsi dan dinyatakan diterima sebagai salah satu persyaratan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains (S.Si)

Tanggal: 12 Desember 2019

Penguji Utama	: Dr. Evika Sandi Savitri, M.P NIP.19741018 200312 2 002	
Ketua Penguji	: Azizatur Rahmah, M.Sc NIP.19900428 2016 0801 2 062	
Sekretaris Penguji	: Ruri Siti Resmisari, M.Si NIP. 19790123 2016 0801 2 063	
Anggota Penguji	: M. Mukhlis Fahrudin, M.SI NIPT. 20142011409	



Mengesahkan,
Ketua Jurusan Biologi

Romaidi, M.Si., D.Sc

NIP. 19810201 200901 1 019

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Umi Sa'diyah

NIM : 15620001

Jurusan : Biologi

Fakultas : Sains dan Teknologi

Judul Penelitian : Peningkatan Kandungan Flavonoid Kalus Delima Hitam (*Punica Granatum L.*) Dengan Penambahan *Polyethylene Glicol* (PEG) 6000 Melalui Teknik *In Vitro*

menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-banar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan data, tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan atau pikiran saya sendiri, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar pustaka. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 12 Desember 2019
Yang membuat pernyataan,



Umi Sa'diyah
NIM. 15620001

PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar Pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipan hanya dapat dilakukan seizin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.



MOTTO

Sesungguhnya bersama kesulitan pasti ada kemudahan

(QS. Al-Insyirah 5 &6)

**Learn for, yesterday, live for today, hope for tomorrow. The important thing
is not to stop questioning (Albert Einstein)**

**Bermimpilah seakan kau akan hidup selamanya. Hiduplah seakan kau akan
mati hari ini (James Dean)**

**Malamnya tidur dan bermimpi. Paginya bangun dan mengejar mimpi
(Fiersa Besari)**



HALAMAN PERSEMBAHAN

Puji syukur kehadiran Allah SWT yang telah memberikan rahmat, hidayah serta inayahnya sehingga ananda bisa menyelesaikan Skripsi ini tepat pada waktunya. Atas berkat rohmat Allah yang maha kuasa ananda persembahkan karya ini untuk orang yang sangat ananda ta'dhimi dan sayangi yaitu Ayah Ibunda tercinta.

Bapak Kambali dan Ibu Jamini

Tiada hentinya telah memberikan semangat, doa, nasehat dan materi atas kelancaran skripsi ini. Doa di setiap sujud sholatmu tak lupa menyebut nama kedua anakmu, semoga Allah SWT menghadiahkan surga untukmu.

Untuk Saudaraku

Amir Mahmudi, Umi Fitria Ningsih, Muhammad Bahri dan semua saudaraku yang selalu ada disaat ananda merasa lelah dan kesulitan.

Terima Kasihku

Pada segenap Guru-Guru dan Dosen-Dosenku yang telah memberikan ilmu dan pengetahuan padaku

Terima kasih kepada teman-teman Biologi 2015 yang telah memberikan warna selama beberapa tahun ini.

Teruntuk Orang-orang Terdekatku

Rofifah Durrotul Hikmah, Adelia Rosadi, Elisa Putri, Lil hanifah yang selalu memberikan motivasi serta ikhlas menemaniku dikala suka dan duka, menyemangatiku dikala aku merasa putus asa dan menyerah sehingga pada akhirnya aku dapat menyelesaikan skripsi ini dengan lancar.

KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum Wr. Wb.

Syukur Alhamdulillah penulis haturkan kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan Rahmat dan Hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul: Peningkatan Kandungan Flavonoid Kalus Delima Hitam (*Punica granatum L.*) dengan Penambahan *Polyethylene Glicol* (PEG) 6000 melalui Teknik *In Vitro*. Sholawat serta salam senantiasa tercurahkan kepada baginda rasul Muhammad SAW beserta keluarga dan sahabatnya.

Selanjutnya penulis haturkan ucapan terimakasih seiring do'a dan harapan *jazakumullah ahsanal jaza'* kepada semua pihak yang telah membantu terselesaikannya Skripsi ini. Serta ucapan terima kasih kepada:

1. Bapak Prof. Dr. Abdul Haris, M.Ag, selaku Rektor UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Dr. Sri Harini, M.Si, selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Bapak Dr. Romaidi, M.Si., D.Se, selaku Ketua Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Ibu Ruri Siti Resmisari, M.Si, selaku Dosen Pembimbing yang telah sabar memberikan bimbingan, arahan dan memberikan waktu untuk membimbing penulis sehingga Skripsi ini terselesaikan dengan baik. Semoga Allah SWT selalu melimpahkan Rahmat-Nya kepada beliau dan keluarga.
5. M. Mukhlis Fahrudin, S.SI, selaku Dosen Pembimbing integrasi sains dan agama yang memberikan arahan serta pandangan sains dari perspektif islam sehingga Skripsi ini terselesaikan dengan baik. Semoga Allah SWT selalu melimpahkan Rahmat-Nya kepada beliau dan keluarga.
6. Dr. Evika Sandi Savitri, M.P. dan Azizatur Rahmah, M.Sc, selaku dosen penguji yang telah memberikan ilmu yang sangat berguna bagi penulis.
7. Dr. Hj. Bayyinatul Muchtaramah, M.Si sebagai dosen wali yang telah banyak memberikan saran dan motivasi selama perkuliahan.

8. Ibu Ruri Siti Resmisari, M.Si, selaku Kepala Laboratorium Kultur Jaringan Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang, yang sudah membantu penulis dalam melaksanakan penelitian dari awal sampai akhir pelaksanaan.
9. Segenap Bapak/Ibu Dosen dan Laboran Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang yang telah memberikan bimbingan kepada penulis.
10. Ibundaku tercinta, Ayahandaku tersayang, dan kakak tercinta yang selalu memberikan yang terbaik dan berjuang tak kenal lelah untuk peneliti.
11. Semua teman-teman Biologi Angkatan 2015 yang telah berjuang bersama meraih cita, karena kalian aku bisa menjalani bangku perkuliahan dengan berbagai pengalaman yang sudah ku dapatkan.
12. Semua Keluarga Besar Pondok Pesantren Sabilurrsyad yang sudah mendukung dan memberikan semangat sehingga skripsi ini telah selesai dengan baik.

Semoga Allah SWT memberikan balasan atas bantuan dan do'a yang diberikan kepada penulis. Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan Skripsi ini masih terdapat kekurangan dan penulis berharap Skripsi ini bisa memberikan manfaat bagi penulis khususnya, bagi pembaca pada umumnya. *Aamiin Ya Rabbal Alamiin.*

Wassalamu'alaikum Wr. Wb.

Malang, 12 Desember 2019

Penulis,

Umi Sa'diya

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSETUJUAN	iii
HALAMAN PENGESAHAN	iv
HALAMAN PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	v
HALAMAN PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI	vi
HALAMAN MOTTO	vii
HALAMAN PERSEMBAHAN	vii
KATA PENGANTAR	ix
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
ABSTRAK	xvi
ABSTRACT	xvii
ملخص البحث	xviii
BAB 1 PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	7
1.3 Tujuan Penelitian	7
1.4 Manfaat Penelitian	8
1.5 Hipotesis	8
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	10
2.1 Delima Hitam (<i>Punica granatum</i> L.)	10
2.2 Deskripsi Tanaman Delima Hitam	14
2.3 Kultur <i>In Vitro</i>	17
2.4 Media Kultur <i>In Vitro</i>	22
2.5 Zat Pengatur Tumbuh	22
2.6 Kultur Kalus	25
2.7 Metabolit Sekunder	28

2.8 Meningkatkan Kandungan Senyawa Metabolit Sekunder Melalui Teknik Kultur Jaringan	31
2.9 Biosintesis Senyawa Flavonoid	32
2.10 PEG 6000	36
BAB III METODE PENELITIAN	41
3.1 Rancangan Penelitian	41
3.2 Waktu dan Tempat	41
3.3 Alat dan Bahan	42
3.4 Variabel Penelitian	43
3.5 Prosedur Penelitian	43
3.6 Parameter Pengamatan	47
3.7 Analisis Kandungan Flavonoid	48
3.8 Parameter Pengamatan	50
3.9 Analisis Data	51
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	53
4.1 Pengaruh Pemberian Konsentrasi PEG 6000 terhadap Kuantitas Kalus Delima Hitam (<i>Punica granatum L.</i>)	53
4.2 Pengaruh Pemberian Konsentrasi PEG 6000 terhadap Kualitas Kalus Delima Hitam (<i>Punica granatum L.</i>)	57
4.3 Pengaruh Pemberian Konsentrasi PEG 6000 terhadap Kandungan Flavonoid Kalus Delima Hitam (<i>Punica granatum L.</i>)	63
BAB V PENUTUP	74
5.1 Kesimpulan	74
5.2 Saran	74
DAFTAR PUSTAKA	75
LAMPIRAN	88

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Tanaman Delima (<i>Punica granatum</i> L.).....	16
Gambar 2.2 Warna Kalus pada Eksplan Kotiledon <i>Helianthus annus</i> L.	26
Gambar 2.3 Tekstur Kalus pada Tanaman Tembakau (<i>Nicotiana tabacum</i> L.) ...	27
Gambar 2.4 Bagan Pembentukan Metabolit Primer menjadi Metabolit Sekunder	29
Gambar 2.5 Struktur Dasar Flavonoid	33
Gambar 2.6 Jenis-jenis Flavonoid	33
Gambar 2.7 Biosintesis Flavonoid	35
Gambar 2.8 Struktur Molekul Kimia PEG	37
Gambar 4.1 Hasil identifikasi rata-rata berat kalus pada tanaman delima hitam dengan menggunakan konsentrasi PEG 6000 yang berbed-beda ...	54
Gambar 4.2 Hasil hubungan korelasi PEG dengan berat kalus delima hitam (g)..	54
Gambar 4.3 Hasil pengamatan anatomi kalus delima hitam dengan menggunakan mikroskop	62
Gambar 4.4 Grafik Kurva Larutan Standart Kuersetin	65
Gambar 4.5 Hasil identifikasi kandungan kadar total flavonoid pada kalus delima hitam	66

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Spektrum cahaya yang tampak dan diiringi dengan warna yang komplementer	39
Tabel 3.1 Perlakuan Konsentrasi PEG	41
Tabel 4.1 Ringkasan ANOVA uji Brown-Forsythe dan uji Welch terhadap pengaruh pemberian konsentrasi PEG terhadap rata-rata berat kalus delima hitam	53
Tabel 4.2 Hasil pengamatan pengaruh pemberian konsentrasi PEG 6000 terhadap warna dan tekstur kalus delima hitam (<i>Punica granatum L.</i>) pada hari ke 42 HST	58
Tabel 4.3 Hasil dari hubungan konsentrasi kuersetin (ppm) dengan nilai absorbansi kuersetin pada panjang gelombang 515 nm	64



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Alur Kerja Penelitian	88
Lampiran 2 Komposisi Bahan Kimia pada Media MS (mg/l)	89
Lampiran 3 Perhitungan dan Pengambilan Larutan Stok Hormon.....	89
Lampiran 4 Perhitungan Konsentrasi PEG (%).....	90
Lampiran 5 Data Hasil Rata-rata Berat Kalus Tanaman Delima Hitam (gram)...	90
Lampiran 6 Warna Kalus Delima Hitam pada Media Perlakuan Konsentrasi PEG 6000 yang Berbeda-beda.....	91
Lampiran 7 Tekstur Kalus Delima Hitam pada Media Perlakuan Konsentrasi PEG 6000 yang Berbeda.....	92
Lampiran 8 Hasil Identifikasi Kalus Delima Hitam dengan Menggunakan Mikroskop sebesar 400x.....	92
Lampiran 9 Perhitungan Manual Hasil Penelitian Kandungan Total Flavonoid pada Kalus Delima Hitam.....	94
Lampiran 10 Perhitungan SPSS Hasil Rata-rata Berat Kalus Delima hitam.....	96
Lampiran 11 Perhitungan SPSS Kadar Total Flavonoid Kalus Delima Hitam.....	99
Lampiran 12 Alat – Alat Kultur Jaringan Tumbuhan	100
Lampiran 13 Bahan Penelitian.....	101
Lampiran 14 Kegiatan Penelitian	102

ABSTRAK

Sa'diyah, Umi. 2019. Peningkatan Kandungan Flavonoid Kalus Delima Hitam (*Punica granatum L.*) dengan Penambahan *Polyethylene glycol* (PEG) 6000 melalui Teknik *In Vitro*. Skripsi. Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing Biologi: Ruri Siti Resmisari, M.Si., Pembimbing Agama: M. Mukhlis Fahrudin S.Si.

Kata kunci: Delima (*Punica granatum L.*), PEG 6000, kalus, Senyawa Flavonoid

Delima (*Punica granatum L.*) adalah salah satu jenis tanaman obat yang berhabitat di daerah tropis ataupun subtropis dari dataran rendah ke dataran tinggi sampai sekitar 1000 m dpl. Tumbuhan delima memiliki fungsi dan kandungan zat fenolik yang tinggi sehingga menyebabkan dominannya antioksidan. Tanaman delima juga mengandung bahan aktif yang sangat bervariasi diantaranya golongan fenol, tanin, antosianin, antioksidan, vitamin C dan kandungan flavonoid yang tinggi. Salah satu alternatif yang dapat digunakan untuk meningkatkan kandungan senyawa flavonoid adalah kultur kalus dengan penambahan zat pengatur tumbuh dan PEG 6000. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian PEG 6000 terhadap kuantitas, kualitas dan kandungan senyawa flavonoid pada kalus delima hitam secara *in vitro*. Penelitian ini menggunakan metode deskriptif kualitatif dengan 6 perlakuan dan 5 ulangan. Perlakuan yang digunakan yaitu perbedaan pemberian konsentrasi PEG 6000 sebesar 0%, 5%, 10%, 15%, 20% dan 25%. Data pengamatan berupa data kualitatif dan kuantitatif. Data dianalisis dengan Uji *Brown forsythe* dan Uji *Welch* = 5%. Apabila terdapat perbedaan signifikan maka dilanjutkan Uji *Games Howell* dengan taraf signifikan 5%. Pengujian kandungan senyawa flavonoid dilakukan menggunakan analisis spektrofotometer UV Vis. Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan konsentrasi PEG 6000 yang berbeda-beda memberikan respon yang nyata terhadap kuantitas, kualitas dan kandungan flavonoid kalus delima hitam. Pada perlakuan PEG 5% dapat memberikan pengaruh adanya warna kalus menjadi hijau kekuningan, bertekstur intermediet dan diidentifikasi anatomi kalusnya bersel padat, inti tidak terlihat, vakuola besar dan terdapat butiran pati yang banyak. Secara kuantitatif, kalus delima hitam pada perlakuan PEG 5% memberikan respon yang paling optimal didalam rata-rata berat kalus sebesar 0,7500 gram. Uji kualitatif kandungan flavonoid pada kalus delima hitam menunjukkan hasil bahwa pada semua media perlakuan PEG 6000 mengandung kandungan flavonoid. Pada perlakuan PEG 5% terdapat kadar total flavonoid tertinggi dengan nilai sebesar 30,89 mg/g.

ABSTRACT

Sa'diyah, Umi. 2019. Increasing the content of Flavonoids of Black Pomegranate (*Punica granatum* L.) Callus with the addition of Polyethylene Glycol (PEG) 6000 through In Vitro Technique. Thesis. Department of Biology, Faculty of Science and Technology, Maulana Malik Ibrahim State Islamic University of Malang. Biology Advisor: Ruri Siti Resmisari, M.Si., Religious Counselor: M. Mukhlis Fahrudin, M.Si.

Keywords: Pomegranate (*Punica granatum* L.), PEG 6000, callus, Flavonoid Compound

Pomegranate (*Punica granatum* L.) is a type of medicinal plant that lives in the tropics or subtropics from the lowlands to the highlands about 1000 m above sea level. Pomegranate has the function and content of high phenolic substances that causes the dominant antioxidant. Pomegranate plant also contains high active ingredients, including phenol, tannin, anthocyanin, antioxidant, vitamin C and high flavonoid content. One alternative that can be used to increase the content of flavonoid compounds is callus culture with the addition of growth regulators and PEG 6000. The research aims at determining the influence of PEG 6000 on the quantity, quality and the content of flavonoid compounds in black pomegranate callus through in vitro. The research used a descriptive qualitative method with 6 treatments and 5 replications. The treatment used the difference concentration of PEG 6000 of 0%, 5%, 10%, 15%, 20% and 25%. Observational data were in the form of qualitative and quantitative data. Data were analyzed with the *Brown forsythe* Test and the *Welch* Test = 5%. If there is a significant difference then continued with the *Games Howell* Test with a significant level of 5%. Flavonoid compound content testing was performed using UV Vis spectrophotometer analysis. The research results showed that the addition of different concentrations of PEG 6000 gave a real response to the quantity, quality and content of callus flavonoids of black pomegranate. In PEG 5% treatment can influence the color of the callus to yellowish green, intermediate textured and identified by the anatomy of dense callus cell, invisible core, and large vacuole and many starch granules. Quantitatively, the black pomegranate callus in the 5% PEG treatment gave the most optimal response within callus weight average of 0.7500 grams. Qualitative test of flavonoid content in black pomegranate callus showed that all PEG 6000 treatment media contained flavonoid content. In the PEG 5% treatment, there were total levels of flavonoids with a value of 30.89 mg/g.

ملخص البحث

سعدية، أم. 2019. ارتفاع محتوى فلافونويد لكالس الرمان الأسود (*Punica granatum L.*) مع إضافة فوليتيلين غليجول (Polyethylene Glycol) (PEG) 6000 خلال في المختبر (*In Vitro*). البحث الجامعي، قسم الأحياء، كلية العلوم والتكنولوجيا جامعة الإسلامية الحكومية مولانا مالك إبراهيم مالانج. المشرف: روري ستي ريسمساري، الماجستير، فخر الدين، الماجستير

الكلمات الرئيسية: الرمان (*Punica granatum L.*)، PEG 6000، الكالس، مركب الفلافونويد.

الرمان (*Punica granatum L.*) هو نوع من النباتات الطبية التي تعيش في المناطق الاستوائية أو شبه الاستوائية من الأراضي المنخفضة إلى المرتفعات إلى حوالي 1000 متر فوق مستوى سطح البحر. يحتوي الرمان على وظيفة ومحتوى المواد الفينولية العالية، مما يسبب مضادات الأكسدة السائدة. يحتوي نبات الرمان أيضًا على مكونات فعالة شديدة التباين، أي الفينولات والتانين والأنتوسيانين ومضادات الأكسدة وفيتامين C ومحتوى الفلافونويد العالي، والبدايل الأخرى التي يمكن أن تستخدمها لزيادة محتوى مركبات الفلافونويد هي زراعة الكالس مع إضافة منظمات النمو و PEG 6000 يهدف هذا البحث لان يحدد تأثير إعطاء PEG 6000 على كمية ونوعية ومحتوى مركب الفلافونويد في كالس الرمان الأسود خلال في المختبر (*in vitro*). استخدم هذا البحث وصفيًا نوعيًا مع 6 علاجات و 5 مكررات. العلاج المستخدم هو الفرق في تركيز PEG 6000 بنسبة 0 %، 5 %، 10 %، 15 %، 20 % و 25 %. بيانات الرصد هي في شكل بيانات نوعية وكمية. وحللت البيانات مع اختبار براون فورسيث واختبار ولش = 5 %. إذا كان هناك اختلاف كبير، فسيستمر باختبار غيمس هويل بمستوى أهمية بقدر 5 %. قام اختبار محتوى مركب الفلافونويد باستخدام التحليل الطيفي للأشعة فوق البنفسجية. دلت النتائج البحث أن إضافة تركيزات PEG 6000 المختلفة أعطت استجابة حقيقية على كمية ونوعية ومحتوى مركب الفلافونويد في كالس الرمان الأسود. في علاج PEG 5 % يمكن أن يؤثر على لون الكالس إلى اللون الأخضر المصفر، ويكون محكمًا وسيطًا ويعرف الكالس على الخلايا الكثيف، المحتوى بغير مرئي، فجوة كبيرة، وهناك حبيبات النشا الكثير. وكمية، أعطت الكالس الرمان الأسود في علاج PEG 5 % استجابة الأمثل ضمن في متوسط وزن الكالس أي 0.7500 غرام. دل الاختبار النوعي لمحتوى الفلافونويد في الكالس الرمان الأسود أن جميع وسائل العلاج PEG 6000 تحتوي على محتوى الفلافونويد. في علاج PEG 5 % هناك مستويات إجمالية لاعلى الفلافونويد بقيمة 30.89 ملغم/غ

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Tumbuhan merupakan salah satu makhluk hidup yang diciptakan oleh Allah SWT dengan tujuan tertentu dan tidak hanya secara kebetulan sehingga memiliki nilai guna masing-masing. Salah satu manfaat tanaman bagi manusia ialah sebagai bahan dasar obat tradisional, kosmetik, dan tanaman hias. Firman Allah SWT didalam Surah Asy-Syu'araa' ayat 7 yang berbunyi:

أَو لَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ

Artinya: “ Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapakah banyaknya kami tumbuhkan di bumi itu berbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik?” (QS. Asy-syuaraa/26:7).

Ayat tersebut menunjukkan bahwa Allah SWT menumbuhkan berbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik. Menurut Shihab (2010), Kalimat *أَو لَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ* menyatakan bahwa makhluk-Nya diperintahkan untuk memikirkan dan mempelajari bumi. Kalimat *كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا* menyatakan tentang berbagai macam tumbuh-tumbuhan yang tak terhingga jumlahnya. Sedangkan kalimat *مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ* bermakna tumbuh-tumbuhan yang baik memiliki banyak manfaat. Menurut Chauhan (2011), Salah satu tanaman yang tergolong tanaman yang baik dan memiliki manfaat yang sangat banyak ialah Delima (*Punica granatum L.*).

Delima adalah salah satu jenis tanaman obat tradisional yang tumbuh di daerah tropis ataupun subtropis dari dataran rendah ke dataran tinggi sampai sekitar 1000 m dpl (Jayesh, 2004). Delima tergolong buah yang berasal dari Iran, Afganistan, Himalaya dan Pakistan (Deepika, 2012). Dahulu kala tanaman delima ini sering dibudidayakan di daerah Madeterania, Malaysia, Asia Tenggara, Afrika serta di seluruh kawasan India dan Afrika tropis (Khasanah, 2011).

Tumbuhan delima memiliki fungsi dan kandungan zat fenolik yang tinggi sehingga menyebabkan dominannya antioksidan (Ahad, 2018; Karasu, 2012; Kumar, 2012; Basiri, 2013; Shiban, 2012; Shadab, 2017; Sumathy, 2013; Jeevarathinam, 2017; Mejia, 2010). Aktivitas antioksidan di dalam tubuh manusia memiliki peran di berbagai kegiatan farmakologi diantaranya, antibakteri (Hasan, 2018; Mansour, 2013; Elaleem, 2016), Antimikroba (Elbatonony, 2018; Marchi, 2015), antidiabetes (Bektas, 2007), anti-penuaan (Rajan, 2011), antitumor (Sadik, 2014), antiinflamasi dan anti kanker (Faria, 2011; Jahromi, 2018; Sharma, 2017). Tanaman delima mengandung bahan aktif yang sangat bervariasi diantaranya golongan fenol, tanin, antosianin, antioksidan, vitamin C dan kandungan flavonoid yang tinggi (Purwantini, 2017).

Tanaman delima memiliki varian warna yang berbeda sehingga dikelompokkan menjadi tiga varietas diantaranya delima merah, delima hitam dan delima putih (Thulasiram, 2013). Delima hitam mengandung metabolit sekunder yang tinggi apabila disejajarkan dengan delima merah dan delima putih sehingga bahan dasar yang sering digunakan sebagai obat tradisional adalah delima hitam (Andriani, 2015). Bagian-bagian yang sering digunakan untuk obat-obatan ialah batang, biji, akar, daun dan buah (Widhiasih, 2017).

Buah delima mengandung kandungan flavonoid lebih banyak sebanyak 3 kali lipat jika dibandingkan dengan tanaman teh hijau, jeruk dan wine. Flavonoid berperan sebagai radikal bebas di dalam tubuh sehingga mampu memperbaiki sel-sel yang sudah rusak dan memberikan perlindungan pada kulit (Madhawati, 2012). Berdasarkan Penelitian di UPT Laboratorium Analitik Universitas Udayana menyatakan bahwa kulit buah delima memiliki kandungan kadar total

flavonoid sebesar 1148,52 mg/100gram. Sedangkan, kandungan polifenol pada buah delima sebesar 1,56 mg/ml. Hal ini ditambahkan oleh Li Y (2006), Kandungan senyawa flavonoid khususnya polifenol pada biji buah delima sebanyak 14,5 % dan kulit buah delima sebanyak 31,5%.

Flavonoid merupakan salah satu kelompok senyawa fenol yang sering ditemukan di alam dan memiliki zat warna yang bermacam-macam diantaranya merah, ungu, biru dan kuning (Sabrina, 2015). Flavonoid ini berfungsi sebagai zat pengatur tumbuh, zat antimikroba, mengatur proses fotosintesis, antivirus, antiinsektisida, antiinflamasi dan antioksidan secara langsung (Sumathy, 2013). Struktur dasar dari flavonoid yaitu *2-phenyl-benzo(a)pyrane* atau *inti flavane*, yang terbentuk dari 2 cincin *benzena* yang berikatan dengan cincin *pyrane* (Rusmaputeri, 2018). Hal ini diperkuat oleh Kholisa (2018), tanaman delima memiliki kandungan *polifenol* seperti *antosianin*, *tannin*, *alkoloid* dan *flavonoid*.

Banyaknya manfaat dari flavonoid menyebabkan tingginya permintaan di dalam memproduksi ekstrak flavonoid pada tanaman delima hitam sehingga perlu dilakukan perbanyak tanaman. Memproduksi senyawa flavonoid dari ekstrak daun tanaman yang utuh akan mengakibatkan ketersediaan spesies terbatas, biaya mahal serta menghasilkan kandungan metabolit sedikit (Chattopadhyay, 2002). Dengan adanya masalah tersebut, alternatif yang dapat digunakan untuk meningkatkan kandungan metabolit sekunder adalah kultur kalus. Menurut Budiyantri (2002), salah satu cara membudidayakan tanaman dapat melalui kultur *in vitro*. Hal ini bertujuan untuk mempoliferasi massa sel yang masih belum terdeferensiasi dan mengelola bentuk yang tidak beraturan.

Kelebihan dari kultur kalus ini diantaranya ialah menghasilkan metabolit dengan kadar yang lebih tinggi dibandingkan dengan metabolit yang diambil langsung dari perbanyakan tanaman melalui konvensional. Hal ini dikarenakan kultur kalus mempunyai pasokan zat hara dan proses metabolisme yang terkontrol sehingga dapat diperoleh hasil yang sempurna (Sutini, 2017; Sitorus, 2011). Menurut Sudrajat (2012), Kadar flavonoid dari kalus tanaman *Echinacea purpurea* L. mengalami peningkatan apabila dibandingkan dengan tanaman asalnya. Pada sampel kalus sebanyak 0,35 % dan sampel dari tanaman asli sebanyak 0,28 %.

Kategori kalus yang bagus memiliki karakteristik warna dan tekstur yang sesuai dengan komposisi media yang akan dikulturkan, khususnya dari jenis eksplan dan zat pengatur tumbuh (Sugiyarto, 2014). Kalus tersebut berfungsi sebagai penanda berhasil tidaknya terakumulasi kandungan metabolit sekunder. Kalus yang mengandung metabolit sekunder tinggi memiliki tekstur yang kompak (*non friabel*) serta memiliki warna hijau. Anatomi kalus metabolit dapat dilihat dengan menggunakan mikroskop dan memiliki ciri-ciri diantaranya ukuran kecil, sitoplasma padat, inti terlihat kecil dan vakuolanya besar (Indah, 2013). Berdasarkan penelitian sebelumnya, Media perlakuan yang cocok digunakan dalam kultur kalus delima hitam yaitu 0,25 mg/L NAA dan 1 mg/L BAP. Pada hormon tersebut kalus delima hitam mampu memberikan pengaruh terhadap presentase pertumbuhan dan berat kalus serta memiliki warna hijau putih kemerahan yang kompak (Umrotin, 2018)

Tumbuhan akan menghasilkan produk metabolit sekunder yang tinggi apabila diberi perlakuan dengan cara mengoptimasi faktor fisiologi lingkungan hidup sel.

Salah satu cara untuk mengoptimasi faktor fisiologi lingkungan hidup pada sel adalah zat pengatur tumbuh, memodifikasi nutrisi pada media tumbuh, prekursor dan elisitor yang digunakan sebagai sintesis metabolit sekunder (Yulinda, 2010). Komposisi media elisitor di dalam meningkatkan metabolit sekunder merupakan bagian yang penting dalam penentuan arah pertumbuhan, seperti kultur kalus (George dan de Klerk, 2008).

Elisitor merupakan stimulus dari fisika, kimia dan biologi yang tergolong dari faktor eksternal dan memiliki fungsi untuk menginduksi ketahanan dan kandungan metabolit pada tanaman (Zulhilmi, 2012). Sistem kerja elisitor ini berfungsi untuk memacu pembentukan metabolit sekunder melalui jalur sekunder yang sudah aktif sehingga mampu merespon cekaman dari biotik dan abiotik (Ningsih, 2014). Macam-macam elisitor dapat dibagi menjadi 2 macam diantaranya ialah elisitor biotik dan elisitor abiotik. Elisitor biotik dapat digolongkan menjadi elisitor endogen dan eksogen (Anand, 2010).

Elisitor endogen merupakan elisitor yang berasal dari tanaman itu sendiri yang dipengaruhi oleh adanya reaksi sekunder yang diinduksi oleh sinyal biotik dan abiotik. Salah satu contohnya ialah oligomer alginate dan hepta- β -glukosida (Namdeo, 2007; Shilpa, 2010). Sedangkan elisitor eksogen merupakan elisitor yang didapatkan dari luar sel yang tergolong dari hasil reaksi atau mediator endogen misalnya, polisakarida, enzim, pathogen dari jamur (kitin dan glucon) dan asam lemak (Manjula, 2012).

Elisitor abiotik merupakan senyawa kimia dan polutan misalnya seperti, senyawa anorganik, detergen, peptisida, aerosol, salinitas yang tinggi, suhu

ekstrim, logam berat (Cu^{2+}) dan tekanan osmotik (PEG). Ditambahkan oleh Jannah (2016), Penggunaan elisitor abiotik ini berfungsi untuk mengakumulasi pertumbuhan dan kandungan metabolit sekunder pada kultur kalus tanaman. Salah satu jenis elisitor yang sering digunakan sebagai peningkatan kandungan metabolit sekunder adalah PEG (*Polyethylene Glycol*) (Sharma, 2011).

PEG merupakan salah satu senyawa yang bersifat non ionik dan dapat larut didalam air sehingga memiliki peran untuk menurunkan potensial osmotik melalui peristiwa aktivitas didalam matriks sub-unit etilena oksida (Yulinda, 2010). Dengan adanya aktivitas tersebut, tanaman tidak dapat menyerap air pada media sehingga menyebabkan tanaman menjadi stress osmosis dan mengalami tekanan turgor pada dinding sel (Djazuli, 2010). Plasmolisis pada tanaman dapat digunakan sebagai signal bagi membran plasma untuk meningkatkan protein osmoprotektan yang berperan sebagai pendorong didalam mensintesis Asam Absisat (ABA). Terbentuknya ABA dapat digunakan sebagai stimulus protein osmoprotektan untuk mentoleransi kondisi tanaman pada saat kekeringan. Protein osmoprotektan akan berinteraksi dengan system reseptor pada membran plasma sehingga menyebabkan Ca^{2+} intraseluler berperan sebagai *second messenger*. *Second Messenger* ini berfungsi untuk menginduksi transkripsi dan translasi pada enzim-enzim yang bersangkutan dengan jalur metabolit sekunder (Hartanti, 2013).

Hal ini sesuai dengan penelitian dari Zulhilmi (2012), kalus Gatang (*Spilanthes acmella* Murr.) pada perlakuan PEG 2% dan 5% mampu meningkatkan alkaloid dan pada perlakuan PEG 3% dan 4% mampu meningkatkan terpenoid. Namun, senyawa fenolik pada kalus gatang hanya muncul diperlakuan PEG 4%. Yulinda (2010) menambahkan bahwa kandungan metabolit sekunder

pada tanaman *Centella asiatica* mampu meningkatkan senyawa triterpenoid pada penambahan PEG 1% dan 2%. Hal ini ditambahkan oleh Fakhri (2010), kalus *Theobroma cacao* pada perlakuan PEG 1% memberikan respon peningkatan kandungan katekin.

Berdasarkan uraian diatas, maka dilakukan penelitian yang berjudul “Peningkatan Kandungan Flavonoid Kalus Delima Hitam (*Punica granatum L.*) dengan Penambahan *Polyethylene Glycol* (PEG) 6000 melalui Teknik *In Vitro*”. Penelitian ini memiliki tujuan untuk melihat ada tidaknya pengaruh PEG 6000 terhadap kandungan flavonoid pada delima hitam.

1.2. Rumusan Masalah

Rumusan masalah yang digunakan dalam penelitian ini yaitu:

1. Bagaimana pengaruh penambahan PEG 6000 terhadap kuantitas kalus pada tanaman delima hitam (*Punica granatum L.*)?
2. Bagaimana pengaruh penambahan PEG 6000 terhadap kualitas kalus pada tanaman delima hitam (*Punica granatum L.*)?
3. Bagaimana pengaruh penambahan PEG 6000 terhadap kandungan flavonoid kalus pada tanaman delima hitam (*Punica granatum L.*)?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu:

1. Mengetahui pengaruh penambahan PEG 6000 terhadap kuantitas kalus pada tanaman delima hitam (*Punica granatum L.*).
2. Mengetahui pengaruh penambahan PEG 6000 terhadap kualitas kalus pada tanaman delima hitam (*Punica granatum L.*).

3. Mengetahui pengaruh penambahan PEG 6000 terhadap kandungan flavonoid kalus pada tanaman delima hitam (*Punica granatum L.*).

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat yang diperoleh dari penelitian ini yaitu:

1. Memberikan informasi tentang upaya konservasi untuk mencegah kepunahan tanaman delima hitam (*Punica granatum L.*).
2. Memberi informasi tentang kandungan flavonoid kalus pada tanaman delima hitam (*Punica granatum L.*).
3. Sebagai alternatif didalam meningkatkan kandungan flavonoid pada tanaman delima hitam (*Punica granatum L.*).
4. Memberi informasi tentang konsentrasi PEG yang cocok digunakan dalam pertumbuhan kalus pada tanaman delima hitam (*Punica granatum L.*) dan produksi senyawa flavonoid.

1.5 Hipotesis

Hipotesis yang digunakan dalam penelitian ini yaitu:

1. Terdapat pengaruh pemberian PEG 6000 terhadap kuantitas kalus pada tanaman delima hitam (*Punica granatum L.*).
2. Terdapat pengaruh pemberian PEG 6000 terhadap kualitas kalus tanaman pada delima hitam (*Punica granatum L.*).
3. Terdapat pengaruh penambahan PEG 6000 terhadap anatomi kalus pada tanaman delima hitam (*Punica granatum L.*).
4. Terdapat pengaruh pemberian PEG 6000 terhadap kandungan flavonoid kalus pada tanaman delima hitam (*Punica granatum L.*).

1.6 Batasan Masalah

Batasan masalah pada penelitian ini yaitu:

1. Eksplan yang digunakan adalah kalus delima hitam yang sudah habituade dan dipotong kecil-kecil dengan ukuran sekitar 0,5 – 1,0 cm.
2. Media dasar tanam yang digunakan yaitu MS (Murashige and Skoog) yang ditambahkan dengan 30 gr sukrosa (Deepika, 2012).
3. Zat pengatur tumbuh yang digunakan dalam menginduksi kalus pada tanaman delima hitam yaitu NAA 0,25 mg/L + BAP 1 mg/L (Umrotin, 2018).
4. Elisitor yang digunakan dalam meningkatkan kandungan metabolit sekunder pada senyawa flavonoid adalah PEG 6000 dengan menggunakan konsentrasi 0 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, dan 25 %.
5. Inkubasi dilaksanakan di ruang steril dengan suhu sekitar 21⁰C.
6. Pelarut yang digunakan dalam melakukan proses ekstraksi pada tanaman delima hitam adalah methanol 80 % dan larutan standart quersetin.
7. Senyawa metabolit sekunder khususnya flavonoid dapat diukur kadar totalnya dengan menggunakan Spektrofotometer UV-Vis dan bertempat di Laboratorium Genetika, Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
8. Parameter yang digunakan untuk melihat perkembangan kalus pada tanaman delima hitam yaitu berat kalus, warna, tekstur dan anatomi kalus serta pengamatan kandungan flavonoid.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Delima Hitam (*Punica granatum L.*)

2.1.1 Delima Hitam dalam Perspektif Islam

Tanaman yang tumbuh di dalam bumi ini memiliki manfaat yang sangat banyak bagi makhluk hidup lainnya. Tanaman juga memiliki kandungan senyawa yang bermacam-macam sehingga dapat dimanfaatkan oleh kholifah sebagai bahan dasar obat-obatan. Didalam Al-qur'an telah dijelaskan bahwa Allah SWT menumbuhkan berbagai macam jenis tumbuhan yang baik untuk dianugerahkan kepada makhluknya agar dipelajari, dirawat, dan dimanfaatkan oleh kholifah yang beriman. Firman Allah SWT didalam Surah Luqman ayat 10 yang berbunyi:

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

Artinya : *“Dia menciptakan langit tanpa tiang sebagaimana kamu melihatnya, dan Dia meletakkan gunung-gunung (di permukaan) bumi agar ia (Bumi) tidak menggoyahkan kamu; dan memperkembangbiakan segala macam jenis makhluk bergerak yang bernyawa di bumi. Dan Kami turunkan air hujan dari langit, lalu kami tumbuhkan padanya segala macam tumbuh-tumbuhan yang baik. (QS. Luqman/31:10).*

Ayat tersebut menjelaskan tentang kekuasaan Allah SWT didalam menurunkan air hujan dari langit ke bumi, kemudian dari hujan itulah Allah SWT menumbuhkan berbagai macam tumbuhan yang baik. Ibnu Katsir dalam Al- Sheikh (2000) menafsirkan bahwa Allah SWT menumbuhkan berbagai macam jenis tumbuh-tumbuhan yang baik dan memiliki berbagai manfaat, diantaranya sebagai obat, hiasan ataupun sebagai makanan.

Selain itu, Al Qurtubi (2009) menafsirkan tentang tanaman yang baik itu memiliki bentuk, warna dan kandungan metabolit yang tinggi sehingga dapat dimanfaatkan sebagai bahan dasar obat tradisional. Salah satu tumbuhan yang dapat dimanfaatkan sebagai tanaman obat ialah delima hitam. Menurut Ahad (2013), tumbuhan delima memiliki fungsi dan kandungan zat fenolik yang tinggi sehingga menyebabkan dominannya antioksidan. Tanaman delima telah dijelaskan didalam Al-qur'an Surah Al-An'am ayat 99:

وَهُوَ الَّذِي أَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَخْرَجْنَا بِهِ نَبَاتَ كُلِّ شَيْءٍ فَأَخْرَجْنَا مِنْهُ خَضِرًا نُخْرَجُ مِنْهُ حَبًّا
مُتَرَكَبًا وَمِنَ النَّخْلِ مِنْ طَلْعِهَا قِنْوَانٌ دَانِيَةٌ وَجَنَّاتٍ مِّنْ أَعْنَابٍ وَالزَّيْتُونَ وَالرُّمَّانَ مُتَشَبِهًا وَغَيْرَ
مُتَشَبِهٍ أَنْظُرُوا إِلَى ثَمَرِهِ إِذَا أَثْمَرَ وَيَنْعِهِ إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَاتٍ لِّقَوْمٍ يُؤْمِنُونَ

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

Ayat diatas menjelaskan bahwa Allah SWT menumbuhkan tanaman yang hijau seperti zaitun, delima dan anggur memiliki bentuk yang hampir mirip dan tidak serupa dengan warna, rasa dan bentuknya. Setiap tanaman memiliki kandungan senyawa yang berbeda-beda dan berperan untuk memberi manfaat kepada makhluk yang mau berfikir dan beriman. Ibnu Katsir (2002), Allah SWT menurunkan air hujan dari langit sesuai takaran yang pasti sehingga menjadikan berkah dan rizki bagi makhlukNya. Air

hujan dapat digunakan untuk menumbuhkan tanaman dan pohon-pohonan yang hijau. Kemudian, Allah SWT menciptakan biji-bijian dan buah-buahan. Tanaman yang menghijau itu saling tersusun antara satu dengan yang lainnya seperti padi dan lainnya. Allah SWT juga menciptakan kurma, zaitun dan delima yang masing-masing saling berdekatan, tetapi mempunyai perbedaan pada buahnya, baik bentuk dan rasanya. Maka manusia diperintahkan untuk berfikir tentang kekuasaan Allah SWT dari tidak ada menjadi ada. Firman Allah SWT didalam Surah Al Baqarah ayat 30 yang berbunyi:

وَإِذْ قَالَ رَبُّكَ لِلْمَلَائِكَةِ إِنِّي جَاعِلٌ فِي الْأَرْضِ خَلِيفَةً قَالُوا أَتَجْعَلُ فِيهَا مَنْ يُفْسِدُ فِيهَا وَيَسْفِكُ الدِّمَاءَ وَنَحْنُ نُسَبِّحُ بِحَمْدِكَ وَنُقَدِّسُ لَكَ قَالَ إِنِّي أَعْلَمُ مَا لَا تَعْلَمُونَ

Artinya: *“Ingatlah ketika Tuhanmu berfirman kepada para Malaikat: “Sesungguhnya Aku hendak menjadikan seorang khalifah di muka bumi”. Mereka berkata: “Mengapa Engkau hendak menjadikan (khalifah) di bumi itu orang yang akan membuat kerusakan padanya dan menumpahkan darah, padahal kami senantiasa bertasbih dengan memuji Engkau dan mensucikan Engkau?” Tuhan berfirman: “Sesungguhnya Aku mengetahui apa yang tidak kamu ketahui (QS. Al Baqarah/2:30).*

Ayat tersebut menunjukkan bahwa Allah SWT memiliki kekuasaan atas segala sesuatu yang ada di bumi. Sedangkan arti kata *“khalifah di muka bumi”* pada ayat tersebut adalah Allah SWT memiliki hak dan kekuasaan di dalam melarang manusia untuk tidak berbuat kerusakan di bumi. Al Maraghi (1993) menafsirkan bahwa manusia merupakan salah satu makhluk Allah SWT yang memiliki akal untuk berfikir dan kebebasan untuk berkehendak sehingga manusia cenderung lebih suka berbuat kerusakan di muka bumi. Oleh sebab itu Allah SWT memberikan anugerah kepada

manusia yaitu ilmu pengetahuan yang bertujuan agar dapat mengemban amanat sebagai khalifah di bumi.

Manusia yang ada di muka bumi ini dijadikan sebagai kholifah sehingga harus bisa mengemban amanah untuk menjalankan tugas dan sunnah-sunnahNya. Seorang khalifah yang ada di bumi ini memiliki tugas yaitu harus peduli dengan alam dan lingkungan sehingga memiliki kewajiban untuk melestarikan tanaman. Dengan adanya manfaat tanaman yang banyak dan permintaan pasar yang tinggi menyebabkan tanaman delima di bumi ini terbatas. Hal ini sesuai dengan Surah Ali Imran ayat 99 yang berbunyi, *“Allah menciptakan segala sesuatu yang ada di muka bumi ini tidak ada yang sia-sia”*. Berbekal dengan akal dan pikiran, manusia akan menemukan cara untuk melakukan upaya didalam membudidayakan tanaman.

Salah satu upaya yang digunakan didalam memperbanyak tanaman ialah meningkatkan kandungan metabolit sekunder dengan cara menguji kandungan yang ada didalamnya. Hal ini akan mewujudkan kedekatan manusia sebagai khalifah dengan tuhanNya. Manusia harus memiliki tindakan berdasarkan nilai estetika di alam dan nilai-nilai keislaman pada saat melakukan perbanyakan tanaman. Salah satu cara yang digunakan untuk meneliti tanaman yaitu mengatur zat-zat hormon dan menyiram air sesuai dengan etika dan aturan islam. Nilai-nilai keislaman yang didapatkan dalam perbanyakan tanaman ini ialah mampu memperlakukan tanaman dengan baik. Memberikan nutrisi kepada tanaman dengan cukup akan

memberikan pengaruh yang baik terhadap pertumbuhannya. Didalam Al-qur'an telah dijelaskan bahwa tanaman telah diciptakan dari setetes air hujan yang turun dari langit ke bumi sehingga kita sebagai manusia memiliki kewajiban untuk melestarikan dan menjaganya.

2.2. Deskripsi Tanaman Delima Hitam

2.2.1 Taksonomi Tanaman *Punica granatum L.*

Klasifikasi Ilmiah pada tanaman delima ialah sebagai berikut (Rahmat, 2007):

Kingdom	: <i>Plantae</i>
Devisi	: <i>Spermatophyta</i>
Sub Devisi	: <i>Angiospermae</i>
Kelas	: <i>Dicotyledonae</i>
Sub Kelas	: <i>Rosidae</i>
Ordo	: <i>Myrtales</i>
Famili	: <i>Punicaceae</i>
Genus	: <i>Punica</i>
Spesies	: <i>Punica granatum L.</i>

2.2.2 Penyebaran dan Syarat Tumbuh

Delima adalah salah satu jenis tanaman yang berhabitat didaerah tropis ataupun subtropis. Delima tergolong buah yang berasal dari Iran, Afganistan, Himalaya dan Pakistan (Deepika, 2012). Pada zaman dahulu tanaman delima ini sering dibudidayakan di daerah Madeterania, Malaysia, Asia Tenggara, Afrika serta di seluruh kawasan India dan Afrika tropis (Khasanah, 2011). Di Indonesia, delima memiliki nama daerah yang

bermacam-macam diantaranya yaitu gangsalan (Jawa), glima (Aceh), dhalima (Madura) dan dalima (Sunda). Namun, masyarakat daerah Inggris mengenal buah delima dengan julukan pomegranate (Rahmat, 2003). Biji delima akan mudah tumbuh ketika ditanam di daerah tanah yang gembur (Thulasiram, 2013).

2.2.3 Morfologi Tanaman *Punica granatum L.*

Tanaman delima dapat tumbuh tinggi sekitar 1,5 meter – 5meter. Delima memiliki ciri-ciri daun yang saling berhadapan, cabang pohonnya tidak memiliki ujung dan memiliki duri yang runcing (An-Najjar, 2011). Menurut Desmond (2000), tanaman delima memiliki daun tunggal dan mengkilap, memiliki tulang menyirip, letaknya berkelompok, warna hijau, berbentuk lonjong dengan pangkal lancip dan memiliki ukuran panjang daun sekitar 3-7 cm dan lebar 0,5-2,5 cm. Bunga pada tanaman delima memiliki ciri-ciri bunga tunggal dan warnaa yang bermacam-macam diantaranya merah, ungu atau putih.

Tanaman delima merupakan tanaman yang tergolong tanaman tahunan dan memiliki ciri-ciri akar tunggang dan mengalami perlambatan didalam masalah akar. Tekstur batang pada tanaman delima sangatlah keras, tumbuh sekitar 2 – 4meter lebih dan tegak lurus keatas. Tanaman delima memiliki cabang yang banyak dan duri yang cukup besar. Tanaman delima akan mengalami musim berbuah dan berbunga sepanjang tahun. Warna bunga delima sangat banyak variannya diantaranya berwarna merah, orange, putih dan tergantung jenisnya (Rahmat, 2003)



Gambar 2.1 Tanaman Delima (*Punica granatum L.*) (Koleksi Pribadi, 2019)

Buah delima berbentuk bulat sampai besar dengan diameter sekitar 5–12 cm, memiliki ukuran biji yang kecil, tersusun tidak beraturan, dan memiliki berat total sekitar 100-300 gram (Emma, 2010). Delima memiliki kulit biji yang tebal dan daging buah yang padat. Daging buah ini dapat dikonsumsi secara langsung bersama bijinya (Rahmat, 2007).

2.2.4 Manfaat dan kandungan Senyawa Kimia Tanaman *Punica granatum L.*

Delima termasuk salah satu buah yang memiliki multifungsi sebagai bahan dasar obat tradisional. Bagian yang sering digunakan untuk obat-obatan ialah batang, biji, akar, daun dan buah (Widhiasih, 2017). Delima memiliki kandungan unsur asam tanic, unsur ini berfungsi sebagai zat desintifektan (Sayyid, 2011). Menurut khasanah (2011), Delima juga memiliki kandungan gula inversi sekitar 20 %. Gula inversi itu berupa 0,5-3,5 % asam sitrat, 5-10 % glukosa dan asam malat. Asam malat ini memiliki peran didalam tubuh manusia yaitu memperlancar metabolisme karbohidrat.

Buah delima memiliki manfaat untuk mencegah atau menurunkan kanker. Cara mengkonsumsi buah delima dengan cara di jus, diambil ekstraknya atau bisa dimakan secara langsung (Sharma, 2017; Jahromi,

2018). Menurut Oci (2014), kulit buah delima mampu merangsang basil typhoid terhambat sehingga mampu mengendalikan infeksi dari berbagai virus misalnya virus HIV, virus polio dan virus herpes simplek. Diperkuat oleh Hasan (2018), kulit buah delima mengandung fenol, steroid, alkaloid tannin dan flavonoid yang tinggi sehingga ekstrak pada kulit buah delima dapat menghambat pertumbuhan bakteri.

2.3 Kultur *In Vitro*

2.3.1 Pengertian Kultur *In Vitro*

Kultur *in vitro* merupakan suatu teknik didalam membudidayakan tanaman dengan menggunakan organ, jaringan serta sel yang masih hidup serta memiliki kemampuan totipotensi sehingga tanaman mampu beregenerasi dan berdeferensiasi menjadi tanaman sempurna. Bagian yang sering digunakan sebagai eksplan yaitu bagian dari hipokotil, kotiledon dan embrio muda. Teknik kultur jaringan biasanya menggunakan jaringan sebagai eksplan diantaranya kultur kalus, protoplasma dan sel, sedangkan organ tanamannya diantaranya daun, akar, pucuk dan bagian bunga (Zulkarnain, 2009).

2.3.2 Prinsip Kultur *In Vitro*

Prinsip dasar yang harus digunakan didalam melakukan teknik kultur *in vitro* ialah sebagai berikut; 1). Kondisi Aseptik merupakan media dan wadah yang akan digunakan harus steril dari bakteri dan jamur agar tanaman tidak mudah terkontaminasi; 2). Perbanyakan Tanaman adalah salah satu teknik yang digunakan untuk memperbanyak tanaman melalui teknik kultur *in vitro*

dengan syarat harus vegetatif; 3). Totipotensi adalah kemampuan jaringan sel pada eksplan untuk melakukan autonom dan totipotensial (Nikmah, 2017).

2.3.3 Teknik Kultur *In Vitro*

Langkah awal yang harus dilakukan didalam teknik kultur *in vitro* ini yaitu memilih dan menyiapkan eksplan yang akan digunakan, menyiapkan media, sterilisasi dan inisiasi eksplan, isolasi bahan tanam, aklimatisasi dan melakukan pemindahan tanaman dari hasil kultur tanaman lapang (Yusnita, 2007). Teknik yang digunakan didalam kultur *in vitro* ini ialah sebagai berikut (Hendaryono, 1994); 1). Kultur anthera yaitu perbanyak tanaman dengan menggunakan serbuk sari; 2). Kultur meristem yaitu perbanyak tanaman dengan menggunakan jaringan yang masih muda; 3). Kultur protoplasma yaitu perbanyak tanaman dengan menggunakan eksplan protoplasma; 4). Kultur embrio yaitu perbanyak tanaman dengan menggunakan embrio. Embrio yang masih muda digunakan sebagai eksplan dan bertujuan untuk mendapatkan tanaman yang viable.

2.3.4 Faktor-faktor yang mempengaruhi Kultur *In Vitro*

Keberhasilan dari hasil kultur *in vitro* dipengaruhi oleh banyak faktor diantaranya sebagai berikut:

1) Eksplan

Eksplan merupakan bagian organ tanaman yang memiliki jaringan masih muda dan ditanam di dalam botol kultur. Jaringan yang masih muda akan dapat membelah secara terus menerus sehingga akan menghasilkan tanaman sempurna (Purwanto, 2008). Menurut Hendaryono (1994), bagian tanaman yang masih muda disebut meristem (Misalnya; ujung batang, keping biji,

ujung akar, daun muda, dan lain-lain). Namun, faktor lain yang dapat mempengaruhi hasil didalam memproduksi kultur *in vitro* adalah ukuran eksplan. Hal ini dikarenakan ukuran eksplan dapat membantu didalam menentukan laju kehidupan ekplan (Zulkarnain, 2009).

2) Sterilisasi Eksplan

Sterilisasi eksplan bertujuan untuk mencuci eksplan dan menghilangkan hama jaringan. Langkah-langkah sterilisasi ada 3 macam diantaranya yaitu menghilangkan kotoran yang menempel pada eksplan dengan cara mencuci. Kedua, direndam dengan menggunakan detergen selama 15 menit. Langkah selanjutnya, direndam dengan menggunakan bakterisida dan fungisida selama 15 menit. Kemudian, dicuci dengan air yang mengalir (Purwantoro, 2008). eksplan yang sudah mengalami infeksi terhadap jamur atau bakteri harus disterilkan terlebih dahulu sebelum ditanam. Namun, eksplan yang sudah parah harus dibuang (Zulkarnain, 2009).

3) Media Tanam

Media tanam merupakan wadah yang digunakan sebagai tempat tumbuh eksplan dan berfungsi untuk merangsang perumbuhan eksplan. Media tanam dibagi menjadi 2 macam diantaranya yaitu media cair dan padat. Media cair mengandung komponen zat kimia yang sudah disuling hingga steril. Sedangkan media padat merupakan media yang memiliki kandungan zat kimia dan ditambahkan dengan zat pematat yaitu agar. Kandungan yang terdapat didalam media ialah sebagai berikut; garam, protein, mineral, gula, sumber unsur makro dan mikro, serta zat pengatur tumbuhan (Hendaryono, 1994).

4) Zat Pengatur Tumbuh (ZPT)

Senyawa organik yang berperan didalam merangsang pertumbuhan tanaman adalah zat pengatur tumbuh (ZPT). Macam-macam zat pengatur tumbuh diantaranya yaitu sitokinin, ethylene, giberelin, auksin, dan lain-lain. Namun, peneliti sering menggunakan zat pengatur tumbuh jenis auksin dan sitokinin. Eksplan akan mengalami penghambatan pertumbuhan ketika kadar auksin di media tanam berlebih. Hal ini dikarenakan auksin akan merangsang tekanan osmotik pada tanaman tinggi, meningkatkan sintesa protein, dan permeabilitas sel terhadap air naik (Hendaryono, 1994). Sedangkan sitokinin berfungsi untuk merangsang pembelahan sel pada tanaman diantaranya yaitu NAA, BA, kinetin dan zeatin (Smith, 1992).

Zat pengatur tumbuh tanaman tidak hanya memiliki nutrisi yang sangat sedikit sehingga mampu memicu tumbuhan menjadi menghambat, mendukung dan dapat merubah fisiologis tanaman. Tanaman akan memiliki respon yang berbeda-beda ketika diberi perlakuan penambahan zat pengatur tumbuh. Hal ini terjadi akibat perbedaan dari macam-macam tanaman itu sendiri dan interaksi dari ZPT endogen yang ada didalamnya (Mandang, 2013).

5) Faktor Lingkungan

Kondisi lingkungan memiliki peran penting didalam keberhasilan perbanyakan tanaman melalui teknik kultur *in vitro*. Fakto-faktor lingkungan yang berpengaruh di dalam kultur *in vitro* ini yaitu cahaya, suhu, kelembapan dan pH. pH yang cocok digunakan untuk tanaman kultur *in vitro* sekitar 5,0 – 6,0. pH dapat diukur dengan menggunakan kertas pH atau pH meter

(Gunawan, 1995). Namun, masalah yang sering timbul didalam kultur *in vitro* ialah kontaminasi, vitrifikasi dan browning. Kontaminasi adalah salah satu gangguan pada eksplan yang ditimbulkan akibat adanya bakteri, virus dan jamur pada eksplannya. Vitrifikasi merupakan kadar sitokinin yang terlalu tinggi sehingga mengakibatkan adanya konsentrasi etilen menjadi tinggi dan rendahnya potensial matrik. Sedangkan browning ialah perubahan warna eksplan menjadi coklat kehitaman yang disebabkan karena adanya pengaruh fisik dan kimia seperti luka, serangit penyakit (Mariska, 2003).

2.3.5 Manfaat Kultur In Vitro

Kultur *in vitro* dapat dimanfaatkan sebagai wadah sarana didalam perbanyak tanaman dengan jumlah relatif yang lebih besar serta memiliki nilai yang unggul dikalangan konsumen dan produsen. Salah satu keunggulan dari teknik ini yaitu tanaman bebas dari hama penyakit, dapat melestarikan plasma nutfah, dan rekayasa genetika (Yuliarti, 2010). Kultur *in vitro* juga akan menciptakan bibit tanaman yang seragam dengan jumlah yang besar dan memiliki sifat yang sama dengan tanaman induknya (Yusnita, 2007).

Keuntungan kultur *in vitro* ini dapat menghasilkan senyawa-senyawa yang ada didalam tanaman sehingga memiliki manfaat sebagai berikut Hensaryono (1994), 1). Akan menghasilkan zat-zat senyawa yang bermanfaat baik diambil secara langsung ataupun teknik kultur *in vitro*; 2). Tidak membutuhkan waktu yang lama ketika ingin memungut hasil metabolit sekunder; 3). Tidak butuh menyiapkan lahan yang luas.

2.4 Media Kultur *In Vitro*

2.4.1 Kandungan Media Kultur *In Vitro*

Faktor yang sangat berperan didalam pertumbuhan dan perkembangan suatu tanaman adalah media. Media kultur *in vitro* memiliki komposisi yang diperlukan tanaman diantaranya ialah sebagai berikut:1). Air merupakan 95 % komponen yang berperan penting di dalam media; 2). Zat-zat Organik merupakan senyawa kimia organik yang sering digunakan didalam media ialah C, H, O. Senyawa ini berfungsi untuk memberikan suplemen kepada tanaman; 3). Tanaman sangat membutuhkan 6 elemen makronutrien (N, K, Mg, S, P, Ca) dengan jumlah yang sangat banyak dan 7 elemen mikronutrien dengan jumlah sedikit meliputi Mn, Mo, B, Fe dan Cl (Whetherell, 1976).

2.4.2 Media MS

Salah satu media yang sering digunakan sebagai perbanyakan *in vitro* adalah Murashige dan Skoog (MS). Media MS mengandung banyak unsur hara organik dibandingkan dengan media lainnya (George dan de, 2008). Media MS merupakan salah satu media yang memiliki kandungan unsur hara paling lengkap diantaranya hormon dan vitamin. Vitamin memiliki fungsi untuk membantu tanaman melakukan proses kehidupannya sehingga mampu bertahan hidup. Vitamin yang sering di pakai di dalam kultur *in vitro* adalah vitamin B1, Vitamin B6, dan asam nikotinat (niasin) (Katuuk, 1989).

2.5 Zat Pengatur Tumbuhan (ZPT)

Hormon berfungsi untuk merangsang pembentukan fitohormon yang ada di dalam tanaman yang tidak berfungsi secara normal. Menurut Sumiasri (2006), Fitohormon merupakan senyawa organik yang memiliki peran di dalam tanaman

hanya sedikit sehingga dapat memberikan pengaruh negatif terhadap pertumbuhan dan proses fisiologis pada tanaman. Proses fisiologis diantaranya yaitu pembukaan stomata, penyerapan unsur hara dan translokasi pada tanaman. Tanpa penambahan ZPT pada medium akan mengakibatkan terhambatnya pertumbuhan dan perkembangan suatu tanaman (Santososo dan Nursandi, 2004).

2.5.1 ZPT NAA

Hormon NAA adalah salah satu senyawa yang tergolong auksin sintetik yang tidak mengalami oksidasi didalam enzimatis serta memiliki sifat kimia yang lebih stabil jika dibandingkan dengan IAA (Zulkarnain, 2009). NAA adalah senyawa sintetik yang memiliki sifat lebih tahan, lebih murah dan tidak mudah terdegradasi (Anwar, 2007). NAA berfungsi sebagai senyawa perangsang akar dan pembentukan kalus dengan konsentrasi sangat rendah (Harahap, 2011). Hal ini didukung oleh penelitian Matsuoka (1979), tanaman terong (*Solanum tuberosum*) yang diberi perlakuan auksin yang lebih rendah dapat menumbuhkan kultur kalus. Eksplan yang digunakan yaitu organ dari daun tanaman terong.

2.5.2 ZPT BAP

Hormon BAP adalah salah satu senyawa yang tergolong sitokinin. Struktur kinetin pada BAP yaitu membentuk isomer BA yang berawal dari 1-benzyl adenine dan memiliki kemampuan untuk mengendalikan aktivitas komponen kimia yang sangat rendah sehingga apabila aktivitas itu bekerja akan berubah menjadi 6-benzyl adenine. BAP memiliki peranan penting yang terkait didalam mempengaruhi fisiologis pada tanaman terutama mendorong terjadinya pembesaran sel, ploriferasi tunas ketiak, serta

penghambatan pada pertumbuhan tunas sehingga mampu mendorong pertumbuhan kalus (Harahap, 2011). Menurut Yasuda (1985) bahwa pemberian BA pada eksplan kotiledon tanaman kopi (*Coffea arabica*) dengan cara kultur *in vitro* dapat memacu pembentukan kalus dengan cepat, tepatnya dengan konsentrasi sebesar 5 μ M.

2.5.3 Interaksi antara NAA dan BAP

Hormon auksin dan sitokinin sering digunakan sebagai induksi kalus. Hal ini diperkuat oleh Zulkarnain (2009), Pemberian NAA dan BAP secara bersamaan akan mengakibatkan adanya respon yang baik didalam pertumbuhan dan perkembangan kalus pada setiap tanaman. Pada penelitian Bonyanpour (2013) menyatakan tentang media terbaik yang cocok terhadap induksi kalus kompak tanaman delima merah yaitu 0,2 mg/L NAA dan 1 mg/L BA.

Menurut Umrotin (2014), Penambahan kombinasi NAA dan BAP yang cocok pada tanaman delima hitam yaitu 0,25 mg/L NAA dan 1 mg/L BAP. Hal ini ditunjukkan pada Duangpon (2009), Kombinasi NAA dan BA dapat menghasilkan kalus metabolit sekunder sejenis *Phyllanthusol* di tanaman *Phyllanthus acidus* dengan konsentrasi 2 mg/L NAA dan 0,5 mg/L BA. Hayati (2010) menyatakan bahwa eksplan dari hipokotil tanaman alfalfa (*Medicago sativa L.*) yang diberi perlakuan interaksi hormon NAA 0 ppm dan BAP 2 ppm dapat mengoptimalkan kalus.

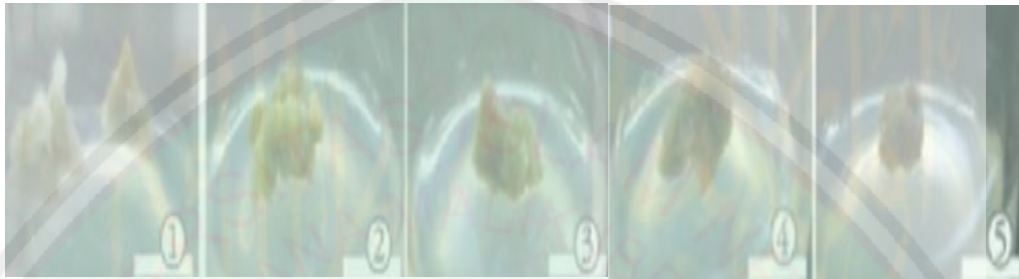
2.6 Kultur Kalus

Kalus terdiri dari kumpulan beberapa sel amorphous yang berasal dari sel-sel jaringan tanaman dan mengalami proliferasi sehingga mengakibatkan bentuk sel menjadi tidak beraturan (belum berdeferiansi). Proliferasi pada kalus dapat dilakukan dengan cara mensubkultur kalus pada medium yang segar dengan waktu yang teratur (Sudarmadji, 2003). Menurut Aisyah (2007), kalus memiliki beberapa tahapan diantaranya yaitu induksi, pembelahan sel dan diferensiasi. Kalus dapat dipelihara dengan cara melakukan subkultur secara berulang-ulang dan berkala misalnya 30 hari sekali.

Kalus yang sudah disubkultur secara regular, maka akan mengalami perubahan fase pertumbuhan kurva sigmoid. Macam-macam fase didalam pertumbuhan kalus ialah sebagai berikut; 1). Fase Lag, sel kalus mengalami pembelahan; 2). Fase eksponensial, proses pembelahan pada kalus mengalami puncak; 3). Fase linear, kalus mengalami penurunan didalam pembelahan sel dan pembesaran sel akan tetapi laju ekspansinya meningkat; 4). Fase deselerasi, fase kecepatan didalam pertumbuhan mulai mengalami penurunan; 5). Fase stationer, dimana jumlah sel dan ukurannya tidak mengalami perubahan (Smith, 2000). Setiap eksplan akan menghasilkan warna kalus yang berbeda-beda (Indah, 2013).

Menurut Hendaryono (1994), perubahan warna pada kalus dipengaruhi oleh pigmentasi, bagian tanaman yang digunakan sebagai eksplan dan cahaya. Warna kalus pada kultur *in vitro* sangat bervariasi seperti warna putih, hijau, kuning jingga atau kekuningan. Kadar sitokinin yang tinggi menyebabkan terbentuknya klorofil pada eksplan kalus (Riyadi, 2004). Menurut Leupin (2000), warna kalus

berubah menjadi hijau disebabkan karena kalus mengandung klorofil yang banyak sehingga sel-sel yang ada didalam kalus masih dapat hidup dan membelah. Namun, warna kalus dari hijau berubah menjadi hijau keputihan atau kekuningan disebabkan karena adanya keterlambatan proliferasi sel dan hanya mengalami perkembangan sel sehingga kalus yang terbentuk hanya sedikit.



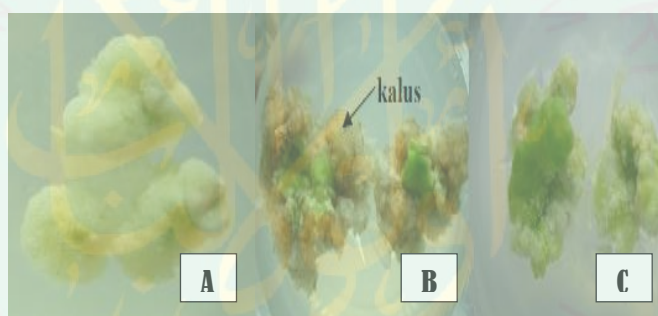
Gambar 2.2 Warna kalus pada eksplan kotiledon *Helianthus annuus* L. (1) kalus berwarna putih (2) kalus berwarna putih kehijauan (3) kalus berwarna hijau kekuningan (4) kalus berwarna hijau kecoklatan (5) kalus berwarna coklat tua (Lutviana, 2012).

Warna kecoklatan atau browning pada kalus disebabkan karena adanya senyawa fenol yang tinggi akibat dari kondisi internal pada eksplan (Andriyani, 2010). Peristiwa ini merupakan peristiwa yang tergolong alamiah dan mengalami perubahan adaptif yang disebabkan adanya pengupasan atau pemotongan eksplan. Sedangkan kalus yang berwarna putih terjadi akibat terbentuknya kloroplas atau degradasi klorofil (Rohmah, 2007).

Menurut Ruswaningsih (2007), Menanam kalus pada media *in vitro* dapat ditentukan dengan menggunakan parameter ukuran rata-rata berat kalus. Secara fisiologis kalus yang masih segar memiliki berat yang sangat banyak. Hal ini disebabkan karena adanya 2 kandungan kalus didalamnya diantaranya air dan karbohidrat. Sedangkan berat basah yang dihasilkan diakibatkan karena adanya air yang terlalu banyak sehingga kecepatan sel pada kalus mampu membelah diri dan membesar. Muryanti (2005) menambahkan bahwa untuk mendapatkan berat

kering pada kalus harus dilakukan pengeringan terlebih dahulu. Hal ini memiliki maksud untuk menurunkan kadar air dan menghentikan aktivitas metabolisme pada kalus sehingga rata-rata berat kalus menjadi konstan.

Tipe kalus dibedakan menjadi 3 macam diantaranya yaitu remah, intermedient dan kompak. Karakteristik dari kalus remah ialah kalusnya mudah dipisahkan dari sel-sel yang lain (mudah pecah) dan sulit diambil dengan menggunakan pinset. Sedangkan kalus kompak memiliki ciri-ciri tekstuk yang sulit dipisahkan dan dilihat secara visual kelihatan padat (Arianto, 2013). Ditambahkan oleh Lestari (2013), kalus intermedient merupakan kalus yang memiliki tekstur semi kompak dan remah. Dapat dilihat di gambar 2.3 tentang beberapa contoh tipe kalus pada teknik kultur *in vitro*.



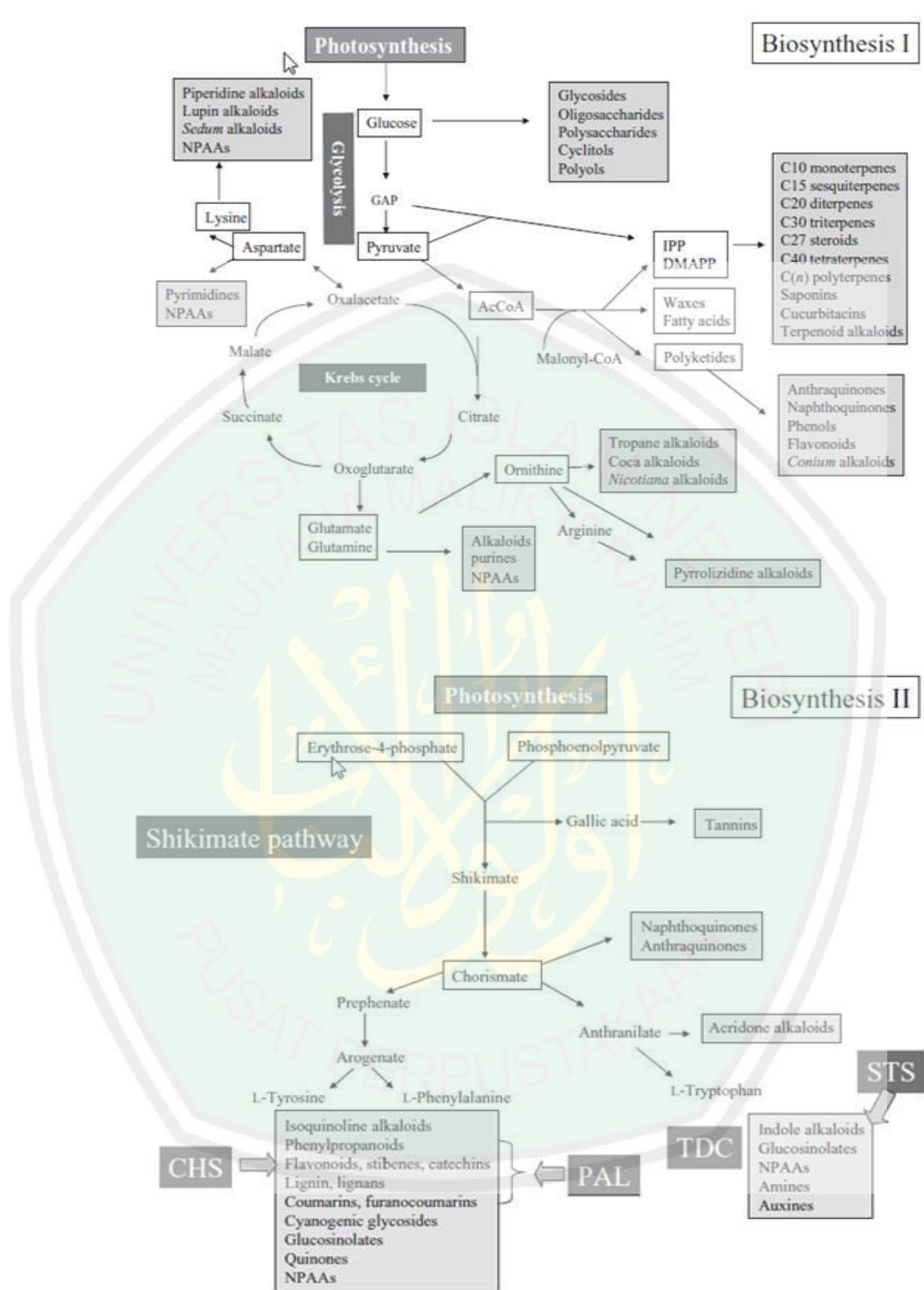
Gambar 2.3 Tekstur kalus pada tanaman tembakau (*Nicotiana tabacum L.*) (A). Kalus Remah (B). Kalus Kompak (C). Kalus Intermediet (Lestari, 2013).

Kultur kalus pada tanaman akan memproduksi senyawa metabolit sekunder ketika penanaman kalus sudah berada di fase stasioner atau fase optimal. Fase optimal itu dimana kalus sudah memiliki tekstur yang kompak. Namun, apabila kalus masih dalam keadaan tekstur yang remah maka masih memiliki masa proliferasi yang panjang sehingga kandungan metabolit yang dihasilkan masih sedikit (Lestari, 2013)

Kultus kalus memiliki manfaat yang sangat banyak didalam aspek metabolisme dan diferensiasi pada tumbuhan diantaranya ialah sebagai berikut; 1). Dapat memproduksi metabolit sekunder dan regulasinya, 2). Mempelajari tentang aspek nutrisi yang dibutuhkan pada tanaman, 3). Untuk menghasilkan variasi semoklonal (genetik dan epigenetik), 4). Diferensiasi dan morfogenesis pada sel dan organ tanaman, 5). Dapat mentransformasikan genetika pada tanaman dengan menggunakan teknik biolistik (Yurwono, 2006).

2.7 Metabolit Sekunder

Hasil dari metabolisme tanaman yang memiliki karakteristik yang menarik bagi setiap makhluk hidup adalah metabolit sekunder. Metabolit sekunder dapat dibentuk dengan menggunakan jalur khusus dari metabolisme primer seperti karbohidrat, lemak dan asam amino (Sutardi, 2008). Menurut Anggarwulan (2001), Metabolisme makhluk hidup dibagi menjadi 2 macam yaitu metabolisme primer dan metabolisme sekunder. Tanaman akan mengalami proses metabolisme primer diantaranya seperti respirasi dan fotosintesis. Namun, apabila metabolit sekunder tidak terbentuk maka akan mengakibatkan ketahanan hidup pada tanaman menjadi berkurang sehingga mudah diserang oleh hama penyakit.



Gambar2. 4 Bagan pembentukan metabolit primer menjadi metabolit sekunder (Wink, 2010)

Faktor-faktor yang mempengaruhi pembentukan metabolit sekunder ialah sebagai berikut (Sutardi, 2008); suhu, air, intensitas cahaya dan pH. Metabolit sekunder memiliki fungsi untuk meningkatkan ketahanan diri (Hajjah, 2012). Menurut Stren (2003), Tanaman akan menghasilkan produk metabolit sekunder dan memiliki peran untuk mempertahankan diri didalam kondisi tertentu. Metabolit sekunder memiliki ciri khas warna yang menarik dan mampu menghadang organisme lain. Namun, masyarakat sering memanfaatkan hasil dari produk metabolit sekunder untuk keperluan medis, dan lain-lain.

Menurut Hartanti (2013), pemberian PEG pada media perlakuan mampu memberikan pengaruh terhadap kalus sehingga kalus mengalami stress osmosis. Semakin tinggi konsentrasi PEG mengakibatkan kalus kekurangan air dan mengalami tekanan turgor pada dinding sel. Hal ini dapat diindikasikan bahwa plasmolisis merupakan signal bagi membran plasma untuk mengaktifkan protein tertentu yang berperan sebagai pendorong di dalam mensintesis ABA (Asam absisat). Terbentuknya ABA dapat digunakan sebagai stimulus protein osmoprotektan untuk mentolerasi kondisi tanaman pada saat kekeringan. Protein osmoprotektan akan berinteraksi dengan sistem reseptor pada membrane plasma sehingga menyebabkan Ca^{2+} interseluler berperan sebagai second messenger. Second messenger ini berfungsi sebagai induksi transkripsi dan translasi pada enzim-enzim yang bersangkutan dengan jalur metabolit sekunder.

Berdasarkan kimiawinya metabolit sekunder dibagi menjadi 3 golongan diantaranya ialah fenol. Senyawa fenol merupakan salah satu kelompok dari hidroksil dan memiliki fungsi sebagai cincin aromatik serta dapat melawan serangan dari herbivora dan pathogen. Fenol akan melewati jalur yang berbeda

dengan metabolisme ketika mengalami proses biosintesis. Hal ini dibantu dengan asam sikimit, asam sikimit ini berperan sebagai pembentuk asam fenilalanin dan memiliki fungsi sebagai pembantu senyawa fenol untuk mensintesis senyawa turunannya seperti senyawa flavon yang dibentuk menjadi isoflavon, antosianin dan flavon (Taiz dan zeigler, 2002).

2.8 Meningkatkan kandungan senyawa metabolit sekunder melalui Teknik Kultur Jaringan

Teknik *In Vitro* pada tumbuhan dapat digunakan sebagai sarana untuk menghasilkan kandungan metabolit sekunder yang lebih tinggi. Metabolit sekunder dapat dihasilkan dari proses biokimia yang terjadi didalam tanaman sehingga proses tersebut juga dapat terjadi didalam proses kultur jaringan. Menurut Hendaryono (1994), metabolit yang dihasilkan dari kultur kalus memiliki kadar metabolit sekunder yang berlebih apabila dibandingkan dengan tanaman aslinya. Peran metabolit sekunder didalam tubuh tumbuhan ialah sebagai berikut; 1). Melindungi tubuhnya dari serangan pathogen dan herbivora; 2). Digunakan benih sebagai pollinator di dalam penyerbukan sehingga dibantu oleh binatang (Rao, 2002).

Pada kultur *in vitro* juga memiliki kelebihan di dalam menghasilkan kandungan metabolit sekunder diantaranya dapat diambil langsung dari kalus atau suspensi sel sehingga tanaman tidak mengalami kelangkaan, waktu yang dibutuhkan singkat dan kalus metabolit sekunder dapat ditingkatkan dengan cara pemberian prekursor dan elisitor ke dalam media perlakuan (Parti, 2004). Biosintesis metabolit sekunder pada tanaman akan terjadi ketika nutrisi pada

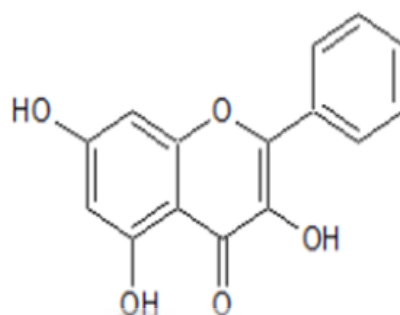
tumbuhan tersebut habis sehingga senyawa-senyawa tertentu dapat memicu didalam memproduksi metabolit sekunder (Bulgakov, 2003)

Hasil analisis kandungan metabolit sekunder pada tanaman mahkota dewa ditemukan mengandung senyawa golongan *alkaloid*, *flavonoid*, *tiamin* dan *saponin* (Gangga, 2007). Tumbuhan yang memiliki kandungan metabolit sekunder dapat ditemukan di kultur kalus daun tanaman katu dan ditanam di media MS. Ketika sudah dikeringkan menunjukkan adanya *kloroform-metanol* yang terkandung didalam tanaman tersebut (Puspitasari, 2002). Menurut Aziz (2006), tanaman *Eurycoma longifolia* memperoleh kandungan metabolit sekunder dengan cara teknik kultur *in vitro*. Dibuktikan dengan kultur kalus tanaman *Eurycoma longifolia* memiliki kandungan metabolit lebih tinggi dibandingkan dengan akar dari tumbuhan induknya.

2.9 Biosintesis Senyawa Flavonoid

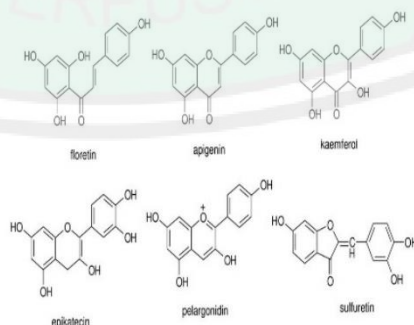
2.9.1 Senyawa Flavonoid

Senyawa flavonoid merupakan salah satu kelompok senyawa *fenol* yang ditemukan di alam, khususnya di tanaman hijau yang mengandung banyak klorofil. Bagian tumbuhan yang sering terdapat senyawa flavonoid ialah bagian dari akar, kulit, bunga, biji dan buah. Senyawa flavonoid memiliki karakteristik kerangka karbon berupa dua cincin *benzene* (C₆) yang digabungkan dengan rantai alifatik 3 karbon (C₃). Senyawa ini memiliki warna yang sangat bermacam-macam diantaranya ungu, biru, merah dan kuning (Wahyulianingsih, 2012). Dapat dilihat struktur senyawa flavonoidnya di gambar 2.5.



Gambar 2.5 Struktur dasar flavonoid (Sjahid, 2008)

Senyawa flavonoid ini memiliki beberapa jenis senyawa dan senyawa ini tergantung pada tingkat oksidasi dari rantai propane system 1,3-diarilpropana. Senyawa flavonoid yang sering ditemukan ialah *flavon*, *antosianidin* dan *flavonol*. Banyaknya senyawa flavonoid disebabkan karena adanya tingkat hidrosilasi atau struktur dari glikosilasi (Rijke, 2005). Senyawa flavonoid jarang ditemukan ketika dalam bentuk aglikon atau tunggal. Hal ini dikarenakan senyawa yang ada didalam tumbuhan memiliki bentuk glikosida. Oleh karena itu, flavonoid dapat dianalisis dengan menggunakan ekstrak awal sehingga senyawa flavonoid ini belum mengalami kerumitan didalam glikosidanya (Ridho, 2013). Penggolongan senyawa flavonoid berdasarkan rantai oksigen dan distribusi dari gugus hidroksilnya dapat dilihat di gambar 2.6.



Gambar 2.6 Jenis-jenis flavonoid (Sjahid, 2018)

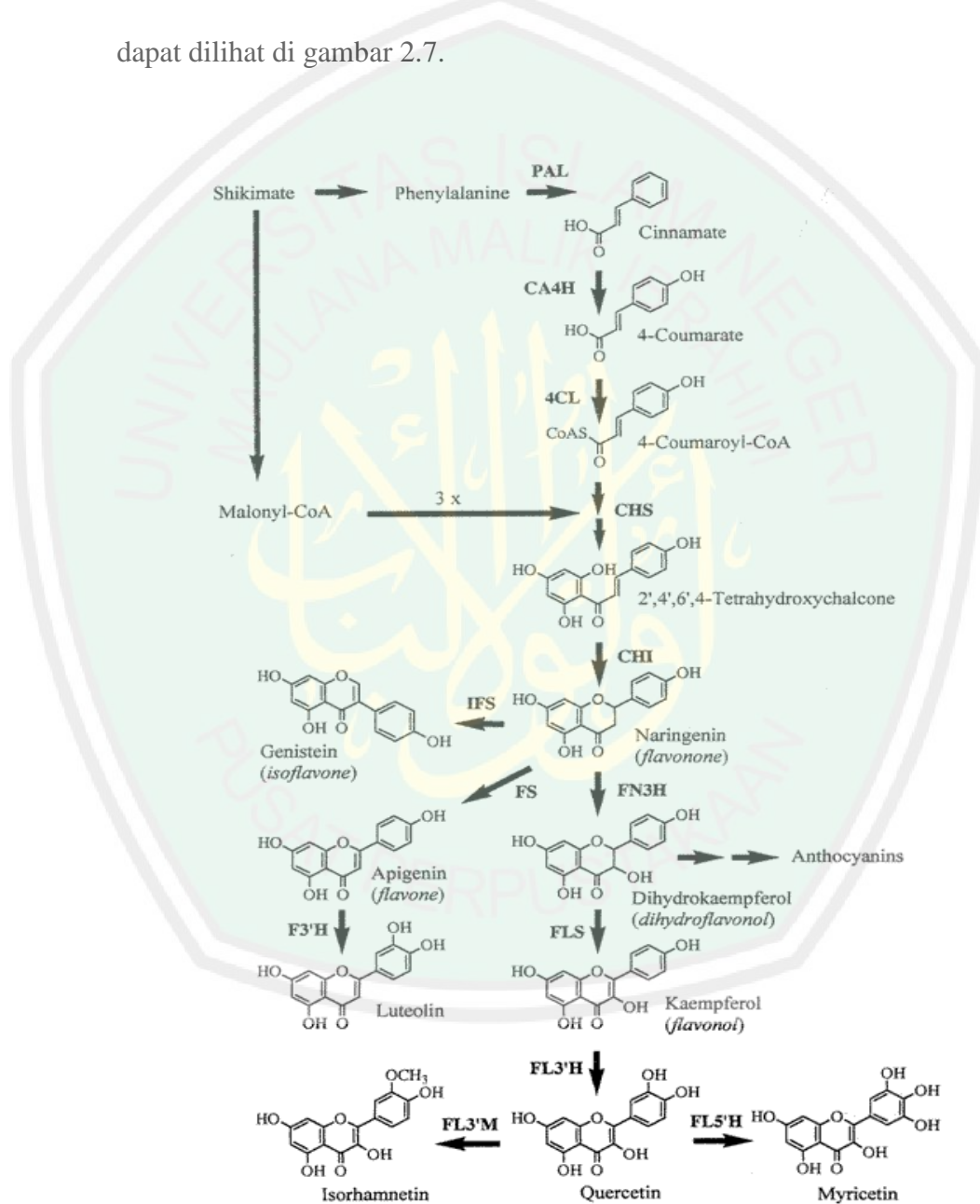
Tanaman akan diambil bahan aktifnya melalui ekstraksi dan metode ekstraksi yang sering digunakan ialah maserasi. Maserasi merupakan salah satu alternatif sederhana yang digunakan untuk mengekstraksi bagian organ tanaman. Ketika masih dilakukan perendaman disarankan untuk diberi pelarut berupa methanol, etanol, atau campuran dari pelarut lain (Kristanti, 2008). Faktor penentu untuk menentukan keberhasilan proses di dalam ekstraksi adalah pelarut. Pelarut berfungsi untuk mencari seberapa besar kandungan bahan aktif yang ada didalam simplisia yang akan digunakan sebagai sampel (Depkes RI, 2008). Pemilihan pelarut didalam ekstraksi harus difikirkan berdasarkan sifat kepolaran suatu zat yang ada didalam pelarut. Senyawa yang bersifat polar akan bisa larut ketika dilarutkan dengan pelarut polar, begitupun sebaliknya (Gritter, 1991).

Flavonoid merupakan tergolong senyawa polar yang memiliki gugus hidroksil yang tidak tersubstitusi. Senyawa flavonoid dapat dilarutkan dengan menggunakan sifat dan kemampuan pelarutnya sesuai dengan tingkat kepolaran pelarut dan senyawa yang di ekstrak. Menurut Sudarmadji (2003), Etanol dan methanol dapat mengekstrak bahan aktif lebih banyak apabila dibandingkan dengan pelarut lainnya. Etanol memiliki sifat yang universal dan memiliki kemampuan untuk mengekstrak komponen polar yang ada di dalam suatu bahan.

2.9.2 Biosintesis Senyawa Flavonoid

Biosintesis senyawa flavonoid akan terjadi apabila jalur sikamat dan jalur asetat malonat bergabung menjadi satu. Dengan adanya jalur sikamat akan membentuk phenylalanine berupa senyawa asam aromatik. Kemudian

senyawa tersebut akan menghasilkan p-coumaric acid. Di jalur asetat melonat menghasilkan acetyl CoA dan mengikat satu molekul CO₂. Jalur metabolisme primer ini akan membentuk fenil propanoid dan jalur biosintesis flavonoid (Davies dan Schwinn, 2006). Secara umum biosintesis flavonoid terdiri dari 2 jalur diantaranya jalur fenil propanoid dan jalur poliketida. Reaksi jalur ini dapat dilihat di gambar 2.7.

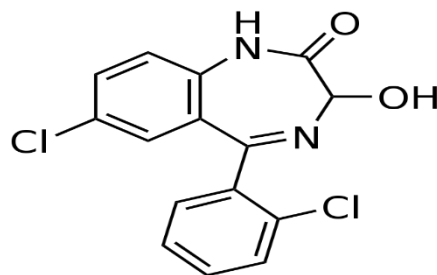


Gambar 2.7 Biosintesis Flavonoid (Taiz dan Zeiger, 2002)

Metabolit sekunder yang tergolong senyawa fenolik dapat diproduksi oleh tanaman ketika tanaman mengalami proses jalur phenylalanin di eliminasi molekul ammonia dari asam sikamat. Enzim Phenylalanine ammonia lyase (PAL) ini merupakan enzim yang dapat memproduksi metabolit sekunder pada tumbuhan di jalur asam sikamat (Taiz dan Zeiger, 2002). Senyawa flavonoid pada tanaman delima hitam dapat dilihat dengan menggunakan *quercetin*, *rutin*, *myricetin*, *kaempferol* dan *apigenin* (Kaewseejan, 2005).

2.10 PEG 6000

PEG (*Polietilen Glycol*) merupakan senyawa polimer yang memiliki rantai panjang dan bersifat mudah larut di dalam air. PEG memiliki bobot molekul sekitar 200-300000 (Leuner, 2000). Menurut Widoretno (2003), senyawa PEG ini memiliki fungsi untuk menurunkan potensial osmotik pada larutan. Hal ini terjadi akibat adanya aktivitas matriks sub-unit etilena oksida yang berperan didalam mengikat molekul air dengan ikatan hidrogen. Konsentrasi PEG dan ukuran molekul yang telah dilarutkan akan menentukan berapa besar potensial osmotik pada larutan. Larutan PEG yang disiramkan ke media tanam akan mengakibatkan kondisi menjadi tercekam sehingga ketersediaan air menurun. Struktur *Polyethylene glycol* (PEG) dapat dilihat pada gambar 2.8



Gambar 2.8 Struktur molekul kimia PEG
(Leuner, 2000)

Senyawa PEG yang ditambahkan ke media padat akan mengakibatkan kondisi menjadi tercekam dan dapat menurunkan potensial air pada medium kultur *in vitro* (Ehsanpour, 2005). Apabila tanaman tidak mampu menyerap air maka akan mengakibatkan potensial osmotik air menurun sehingga tanaman mengalami stress osmosis dan mengandung prolin yang tinggi (Rahayu, 2005). Menurut Hartanti (2013), kekurangan air pada tanaman akan mengakibatkan tekanan turgor pada dinding sel meningkat dan mendorong asam absisat (ABA) untuk meningkatkan kandungan protein osmoprotektan pada membrane plasma.

2.11 Peran PEG Dalam Memproduksi Metabolit Sekunder

Cekaman yang disebabkan oleh radikal bebas yang berlebih didalam tubuh mampu mengakibatkan kerusakan pada O_2 (cekaman oksidatif). Dengan adanya cekaman oksidatif mengakibatkan jalur metabolisme di dalam tubuh menjadi berubah melalui rentetan proses oksidatif. Stress yang disebabkan karena lingkungan eksternal pada tanaman akan memacu terjadinya proses metabolit sekunder (Muryanti, 2005).

Setiap tanaman akan memberikan suatu respon apabila terdapat serangan dari serangga, pathogen, herbivore ataupun cekaman dari biotik dan

abiotik. Respon itu berupa cara untuk melindungi dirinya seperti peningkatan enzim untuk membantu proses pembentukan metabolit sekunder pada tanaman (Ernawati, 1992). Penambahan PEG didalam media kultur dapat meningkatkan kandungan metabolit sekunder pada tanaman. Didalam penelitian Yulinda (2010), pemberian PEG dengan konsentrasi 1 % dan 2 % akan meningkatkan kandungan metabolit sekunder khususnya triterpenoid.

2.1 Spektrofotometer UV-Vis

Spektrofotometri merupakan salah satu alat yang digunakan sebagai alternatif untuk menganalisa berapa jauh energi yang diserap oleh absorbansi yang sudah terisolasi pada panjang gelombang. Sinar yang dihasilkan dari spektrum dan panjang gelombang tertentu dinamakan dengan spektrofotometer. Fotometer merupakan alat yang digunakan untuk mengukur energi yang relatif ditransmisikan (diteruskan) dan diemisikan (Khopkar, 2010). Menurut Sudjadi (2012), pita spectrum UV-Vis terbentuk akibat adanya beberapa eksitasi elektronik pada guus molekul yang kompleks.

Prinsip Spektrometer UV-Vis ini dapat digunakan untuk mengukur panjang gelombang sekitar 200-800 nm kemudian akan dilewatkan melalui larutan-larutan dari suatu senyawa. Elektron yang sudah diikat dengan molekul akan tereksitasi sehingga akan mengakibatkan kuantum naik lebih tinggi dan energi dapat diserap dengan larutan. Apabila elektronnya sudah sedikit akan diikat oleh molekul dan mengakibatkan panjang gelombang yang didapatkan lebih rendah (David, 2010). Spektum cahaya akan tampak ketika di panjang gelombang tertentu dan memiliki warna yang komplementer. Hal ini dapat dilihat ditabel 1 (Bassett, 2013).

Table 2.1 Spektrum cahaya yang tampak dan diiringi dengan warna yang komplementer (Basset, J., 2013)

Panjang gelombang (nm)	Warna	Warna komplementer
400-435	Violet	Kuning-hijau
435-480	Biru	Kuning
480-490	Hijau-biru	Orange
490-500	Biru-hijau	Merah
500-560	Hijau	Ungu
560-580	Kuning-hijau	Violet
580-595	Kuning	Biru
595-610	Orange	Hijau Biru
610-750	Merah	Biru-hijau

Menurut Bahera (2012), Teknik yang sering digunakan untuk menganalisa farmasi adalah spektrofotometri UV-Vis. Parameter yang digunakan ialah pengukuran jumlah radiasi ultraviolet atau zat-zat yang akan diserap ketika didalam larutan. Spektrofotometer UV-Vis juga dapat digunakan untuk menganalisis suatu senyawa yang memiliki warna yang mencolok. Perbandingan intensitas sinar dapat diserap dengan intensitas sinar yang datang (Sitorus, 2010). Neldawati (2013), Nilai Absorbansi ditentukan melalui kadar zat yang ada didalamnya. Semakin banyak zat akan mengakibatkan molekul menjadi banyak dan memiliki kemampuan untuk menyerap cahaya sehingga memiliki panjang gelombang yang besar.

Senyawa flavonoid pada tanaman herbal dapat ditentukan nilai absorbansi warnanya dengan menggunakan metode Spektrofotometer UV-Vis dan diukur dengan Spektrometer UV-Vis. Namun, apabila ingin menghitung

kadar total flavonoid dapat menggunakan kadar kuersetin. Analisis kadar flavonoid ini menggunakan aluminium klorida ($AlCl_3$) (Neldawati, 2013). Menurut Kelly (2011), Golongan senyawa flavonoid digunakan sebagai standarisasi didalam penentuan kadar flavonoid. Senyawa ini memiliki nilai antioksidan yang tinggi pada tanaman yang hijau dan jumlah glikosidnya sebesar 60-70 %.



BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode diskriptif kualitatif dengan 6 perlakuan dan 4 kali ulangan. Perlakuan yang di gunakan adalah pemberian yang berbeda di setiap perlakuan dengan konsentrasi PEG (*Polyethylene Glycol*) 6000 sebesar 0 %, 5 %, 10%, 15 %, 20 % dan 25 %. Perlakuan penambahan konsentrasi PEG 6000 yang digunakan pada penelitian ini ialah sebagai berikut:

Table 3.1 Perlakuan konsentrasi PEG

Notasi	Konsentrasi
P ₀	0 %
P ₁	5 %
P ₂	10 %
P ₃	15 %
P ₄	20 %
P ₅	25 %

3.2 Waktu dan Tempat

Pelaksanaan penelitian Kultur Jaringan Tumbuhan ini dimulai pada bulan Juli – Oktober 2019. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan Tumbuhan Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Sedangkan Analisis Kandungan Kadar Total Flavonoid dilaksanakan di Laboratorium Genetika dan Molekuler Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Malang.

3.3 Alat dan Bahan

3.3.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah gelas ukur, erlenmeyer, oven, alat tanam (gunting, mata pisau, pinset, scalpel), kertas label, petri disk, tissue, botol kultur, cawan petri, batang pengaduk, hot plate dan stirer, timbangan analitik, LAF (*Laminar Air Flow*), mikropipet, rak kultur, kertas pH meter, lampu, pipet tetes, bunsen, kulkas, baskom, autoklaf, botol penyemprotan alkohol, AC (*Air Conditioner*), karet dan plastik petromaks (tahan panas), aluminium foil, plastik warp, spidol, pensil, korek api, penggaris/mistar, penghapus, labu ukur ukuran 10 ml dan 50 ml, mortal dan alu, blander, spektrofotometer UV-Vis UH5300 HITACHI, vortex merk medline, gelas beaker, inkubator, kuvet, corong kaca, vial, rotary evaporator, ayakan 60 mesh, gelas arloji, gelas erlenmeyer, spatula, toples maserasi, hygrometer, thermometer, cawan porselin, pipet volume, tabung sentrifugasi merk Premiere XC-2000.

3.3.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kalus delima hitam (*Punica granatum L.*). Bahan yang akan di butuhkan ketika sterilisasi adalah fungisida, bakterisida, detergen, clorox, aquades, alkohol 70 % dan 90 %, dan aquades steril. Bahan pembuatan media tanam diantaranya yaitu media MS (*Murashige & skog*), gula pasir, PEG (*Polyethylene Glycol*) 6000, agar, zat pengatur tumbuh NAA dan BAP. Bahan yang dibutuhkan untuk ekstraksi adalah 500gram daun dan kalus pada tanaman delima hitam. Bahan yang digunakan dalam menganalisis kandungan flavonoid adalah pelarut

methanol 80 %, larutan standart kuersetin 0,020 gram, Natrium asetat 1 M, HCl, ALCL₃ 10 %, blue tip, kertas perkamen, aquadest dan kertas saring.

3.4 Variabel Penelitian

Variabel penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

1. Variabel Bebas: Penambahan konsentrasi PEG (*Polyethylene Glycol*) 6000 yang berbeda (Konsentrasi 0 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 % dan 25 %)
2. Variabel Terikat: Berat kalus, warna dan tekstur kalus, anatomi kalus, serta kandungan metabolit sekunder yang terdapat pada tanaman delima hitam terutama kandungan flavonoidnya.
3. Variabel Terkendali: Konsentrasi hormon NAA 0,25 mg/L dan BAP 1 mg/L serta pemberian PEG didalam media perlakuan, media MS, suhu, cahaya, pH dan kelembapan.

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Sterilisasi Ruang Tanam

Ruang tanam di sterilisasi dengan cara membersihkan lantai dengan menyapu, kemudian lantai ruang inisiasi dibersihkan sampai bersih sebanyak 1 kali didalam seminggu dengan menggunakan larutan desikfetan tipol atau larutan lainnya. Langkah selanjutnya, ruangan diberi larutan formalin 20 % yang disemprotkan pada tissue dan diletakan di pojok ruangan selama 1 x 24 jam dengan kondisi ruangan tertutup rapat. Selama 12 jam ruangan dilarang dimasuki dikarenakan akan membahayakan didalam pernafasan.

Disiapkan alat-alat *dissecting set* yang digunakan dalam waktu inisiasi, diantaranya yaitu pinset, petridish, scalpel, gunting, dan bunsen. Selanjutnya,

meja LAF (*Laminar Air Flow*) dibersihkan dengan menggunakan alkohol 70 % hingga bersih. Kemudian ditutup LAF (*Laminar Air Flow*) dan lampu UV dinyalakan selama 1 x 24 jam. Apabila sudah selesai, sinar UV dimatikan dan dinyalakan lampu blower dengan kurun waktu 15 menit. Sebelum dimasukan alat-alat diseksi ke dalam LAF disemprot terlebih dahulu dengan menggunakan alkohol 70 %.

3.5.2 Sterilisasi Alat

Alat di sterilisasi dengan cara mencuci terlebih dahulu alat-alat yang akan digunakan, misalnya alat-alat gelas (gelas beaker, botol kultur, cawan petri, dll) dan alat-alat diseksi seperti gunting, piset, scalpel dengan menggunakan detergen dan tipol kemudian dibilas dengan menggunakan air yang mengalir hingga busa bersih. Alat-alat yang sudah dicuci dikeringkan dengan menggunakan alat oven selama 3 jam dan suhu sekitar 121°C . Setelah selesai dikeringkan, alat-alat gelas dikemas dengan menggunakan kertas dan diautoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 90 menit. Sedangkan alat-alat diseksi atau alat-alat yang tergolong logam setelah dioven dibungkus dengan menggunakan aluminium foil agar tetap terjaga kesterilisasiannya. Selanjutnya alat logam yang akan digunakan sebelum dimasukan ke LAF harus disemprot terlebih dahulu dengan menggunakan alkohol 96 % dan dibakar dengan menggunakan api bunsen.

3.5.3 Pembuatan Media

Induksi kalus pada tanaman delima menggunakan zat pengatur tumbuh yaitu NAA 0,25 mg/L dan BAP 1 mg/L. Menurut Emilia (2018) menyatakan

bahwa pemberian ZPT dengan konsentrasi tersebut dapat merespon pertumbuhan dan perkembangan terhadap induksi kalus tanaman delima hitam dengan memiliki warna kalus hijau, putih kemerahan dan tekstur kompak. Sedangkan dilihat dari anatominya, kalus metabolit memiliki karakteristik yaitu sel yang rapat, vakuola besar, mengandung pati didalamnya serta sitoplasma yang padat. Dengan adanya karakteristik di atas, maka diberi perlakuan dengan penambahan PEG 6000 bertujuan untuk mempercepat pertumbuhan kalus dan meningkatkan kandungan metabolit sekunder yang ada pada tanaman delima hitam.

Pembuatan media perlakuan sebanyak 600 ml digunakan untuk 6 perlakuan dengan cara menakar aquadest masing-masing sebanyak 100 ml, lalu menimbang media MS sebanyak 2,658 gr dan gula masing-masing sebesar 18 gram. Kemudian dimasukkan kedalam *beaker glass* bersama aquadest masing-masing sebanyak 100 ml. langkah selanjutnya, pengukuran pH lalu dihomogenkan dengan menggunakan *hotplate stirrer*. Dimasukkan ZPT sebanyak NAA 0,25 mg/L dan BAP 1 mg/L dan ditambahkan dari beberapa konsentrasi PEG perlakuan yang berbeda kedalam masing-masing beaker glass.

Perlakuan yang menunjukkan konsentrasi PEG 0 merupakan perlakuan kontrol yang tidak diberi tambahan PEG 6000 didalam perlakuan. Konsentrasi PEG 5 % dapat dilakukan dengan cara serbuk PEG ditimbang sebanyak 5 mg dan ditambahkan aquadest dengan volume sebanyak 100 ml kemudian dihomogenkan. Konsentrasi PEG 10 % dapat dilakukan dengan cara serbuk PEG ditimbang sebanyak 10 mg dan ditambahkan aquadest dengan volume

sebanyak 100 ml kemudian dihomogenkan. Konsentrasi PEG 15 % dapat dilakukan dengan cara serbuk PEG ditimbang sebanyak 15 mg dan ditambahkan aquadest dengan volume sebanyak 100 ml kemudian dihomogenkan. Konsentrasi PEG 20 % dapat dilakukan dengan cara serbuk PEG ditimbang sebanyak 20 mg dan ditambahkan aquadest dengan volume sebanyak 100 ml kemudian dihomogenkan. Konsentrasi PEG 25 % dapat dilakukan dengan cara serbuk PEG ditimbang sebanyak 25 mg dan ditambahkan aquadest dengan volume sebanyak 100 ml kemudian dihomogenkan. Langkah selanjutnya, larutan media diukur pH dengan menggunakan kertas pH meter sekitar 5,8 – 6,0.

Apabila pH mengalami penurunan dan peningkatan maka harus dinetralkan dengan cara menambahkan beberapa tetes HCL 0,10 N dan NaOH 0,10 N. Langkah selanjutnya, agar-agar ditimbang sebanyak 6 gram dan dimasukkan ke dalam masing-masing *beaker glass* yang berisi Media MS, gula dan aquadest. Kemudian media tersebut dipanaskan diatas kompor dan diaduk hingga homogen sampai mendidih. Setelah mendidih, media dituangkan kedalam botol kultur dan ditutup dengan menggunakan plastik serta diikat dengan menggunakan karet sampai rapat dan diberi kertas label.

3.5.4 Inisiasi

Kalus delima yang berasal dari kotiledon disubkultur kedalam media perlakuan dengan penambahan ZPT NAA 0,25 mg/L dan BAP 1 mg/L. Langkah selanjutnya, ditambahkan berbagai konsentrasi PEG 6000 di setiap

perlakuan dengan taraf konsentrasi 0 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 % dan 25 % dan diinkubasi selama 42 HST.

3.6 Parameter Pengamatan

Parameter pengamatan ini dilakukan melalui 2 tahapan ialah sebagai berikut:

1. Pengamatan pertama dilakukan setiap hari di dalam waktu penelitian. Hal ini bertujuan untuk mengetahui respon pertumbuhan kalus pada setiap harinya dan melihat ada tidaknya kontaminasi pada media dan eksplan.
2. Pengamatan kedua dilakukan pada akhir penelitian, ketika sudah melewati 42 HST yang terdiri dari:

- a. Pengamatan kuantitas kalus

Parameter pengamatan meliputi:

1. Berat kalus

Berat kalus dilakukan dengan cara menimbang berat basah kalus yang dihasilkan dari setiap perlakuan pada akhir pengamatan.

$$\text{Berat Kalus/ Ulangan} = \frac{\text{Berat akhir} - \text{Berat eksplan awal tiap botol}}{\text{Jumlah kalus yang tumbuh pada setiap botol}}$$

$$\text{Rata-rata berat kalus} = \frac{\text{Jumlah berat kalus seluruh ulangan}}{\text{Ulangan}}$$

- b. Pengamatan kualitas kalus

Parameter pengamatan meliputi:

1. Warna kalus

Pengamatan warna kalus diamati dengan cara melihat ada tidaknya perubahan warna pada setiap kalusnya dan diamati di akhir pengamatan.

2. Tekstur kalus

Identifikasi tekstur kalus diamati dengan cara visual pada penampakan fisik kalus diantaranya yaitu bertekstur kompak, remah atau intermediet.

3. Anatomi kalus

Pengamatan identifikasi anatomi kalus dilakukan dengan menggunakan mikroskopik dengan perbesaran 400x.

- c. Pengamatan kandungan flavonoid pada tanaman delima hitam (*Punica granatum L*) menggunakan uji spektrofotometer UV-Vis.

3.7 Analisis Kandungan Flavonoid

Pengujian kandungan metabolit sekunder khususnya flavonoid dilaksanakan di Laboratorium Jurusan Genetika dan Molekuler, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang dengan menggunakan Spektrofotometer UV-Vis yaitu dengan cara mengekstrak kalus dan langkah selanjutnya diuji dengan menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis.

3.7.1 Ekstraksi Kalus

Ekstraksi kalus pada penelitian ini yaitu; kalus delima hitam dipotong kecil-kecil dan dimasukkan ke dalam mortar sebanyak 0,5 g. Kalus tersebut dihaluskan dengan menggunakan alu. Langkah selanjutnya, kalus direndam dengan menggunakan metanol 80 % sebanyak 5 ml di dalam tabung reaksi. Tabung reaksi tersebut divorteks selama 5 menit dan dishaker selama 2 jam., Kalus yang sudah di ekstraksi dibiarkan selama 24 jam.

3.7.2 Penentuan Kandungan Total Flavonoid

3.7.2.1 Pembuatan Larutan Standart Kuersetin

Ditimbang larutan standart kuersetin sebanyak 0,010 mg dan dilarutkan dengan methanol 80% sebanyak 10 ml sehingga diperoleh larutan standart kuersetin 1000 ppm yang digunakan untuk larutan stok. Selanjutnya, membuat larutan standart kuersetin yaitu pelarut acetone: aquadest (50 ml:50 ml) dengan konsentrasi sebanyak blank (0), 12,5 ppm, 25 ppm, 50 ppm, 100 ppm, 200 ppm, 400 ppm sebagai larutan pembandingan. Langkah yang pertama, Larutan standart kuersetin diencerkan dengan methanol 80% sesuai dengan konsentrasi ppm yang dibuat. Kemudian, ditambahkan Natrium asetat 1 M sebanyak 150 μ l, Aluminium (III) klorida 300 μ l, NaOH 1M 1000 μ l dan air suling (air aquadest) sebanyak 550 ml. Campuran tersebut dikocok sampai homogen dan diinkubasi selama 30 menit dengan suhu 37°C. Langkah selanjutnya, pengukuran absorbansi setiap konsentrasi dilakukan dengan menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 515 nm (Yusnawan, 2016). Setelah diperoleh absorbansinya, dilanjutkan dengan membuat kurva kalibrasi sehingga akan diperoleh persamaan regresi (Salmania, 2016).

3.7.2.3 Pembuatan Kurva Standart Kuersetin

Membuat kurva standart dapat dilakukan dengan cara menggabungkan konsentrasi larutan standart dengan hasil absorbansi yang

telah didapatkan dari pengukuran alat spektrofotometer UV-Vis dengan menggunakan panjang gelombang 515 nm (Yusnawan, 2016).

3.7.2.3 Penetapan Kadar Total Flavonoid Dalam Ekstrak

Ditimbang sampel sebanyak 0,5 g dan dilarutkan dengan menggunakan *methanol* 80 % sebanyak 5 ml. Langkah selanjutnya, air suling dimasukan ke dalam tabung reaksi sebanyak 2,5 µl dan ditambahkan ekstrak sampel kalus sebanyak 500 µl. Kemudian, ditambahkan Natrium asetat 1 M sebanyak 150 µl, Alumunium (III) klorida 300 µl, NaOH 1 M sebanyak 1000 µl dan air suling (air aquadest) sebanyak 550 ml. Campuran tersebut dikocok sampai homogen dan diinkubasi selama 30 menit dengan suhu 37°C. Langkah selanjutnya, dilakukan pengukuran absorbansi setiap konsentrasi dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 515 nm (Yusnawan, 2016).

3.8 Parameter Pengamatan

Analisis Kandungan Total Flavonoid

Kandungan total flavonoid dinyatakan sebagai ekuivalen mg kuersetin (QE) (mg kuersetin / ekstrak g) yang dihitung dari rumus di bawah ini (Juan, 2010):

$$C = (c \times V) / m$$

Dimana C itu menunjukkan sebagai kandungan flavonoid total pada ekstrak *Punica granatum* L., ekstrak tanaman (mg/g); c adalah konsentrasi kuersetin dari kurva standart (mg/L) ; V adalah volume ekstrak tumbuhan dan m adalah berat ekstrak *Punica granatum* L. murni.

3.9 Analisis Data

Data pengamatan ini terdiri dari data kualitatif dan data kuantitatif. Data kualitatif merupakan suatu pengamatan yang dapat dilakukan dengan cara melihat secara visual seperti warna, tekstur dan anatomi kalus yang diidentifikasi dengan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400 x sehingga dianalisis dengan cara deskriptif sedangkan data kuantitatif seperti berat kalus dapat dilakukan uji lanjut dengan menggunakan uji statistik Non Parametrik. Uji statistik Non Parametrik ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh terhadap pemberian perlakuan PEG pada induksi kalus kompak tanaman delima hitam. Jika sidik ragam memberikan pengaruh yang nyata pada uji *brown-forsythe* dan uji *welch* = 5 %, maka diuji lanjut dengan menggunakan uji *Games Howell*. Pada taraf 5 % untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan. Pengolahan data dibantu dengan menggunakan software SPSS 16.0.

Data dari uji kandungan flavonoid dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis merupakan data primer yang didapat dari absorbansi larutan kuersetin (pembanding) sehingga dibuat kurva kalibrasi terlebih dahulu. Apabila sudah selesai akan didapatkan persamaan regresi linear yaitu $y = ax + b$ dan satuan hasil yang didapat harus dalam bentuk satuan mg dalam gram.

Hasil pengamatan dapat dianalisis dengan menggunakan uji variansi dan uji nalar tentang pendekatan integrasi sains dan islam. Analisis ini berpedoman dengan beberapa yang terkait dari sumber ayat Al-Qur'an dan

Hadits yang sesuai dengan kategori dalam penelitian serta pemikiran islam. Analisis ini bertujuan untuk mengarahkan kebenaran menurut peneliti terhadap sesuatu yang diciptakaan Allah SWT yang ada komprehensif berdasarkan nilai islam.



BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pengaruh Pemberian Konsentrasi PEG 6000 terhadap kuantitas Kalus Delima Hitam (*Punica granatum L.*)

Berdasarkan hasil penelitian ini, pada normalitas dan homogenitas rata-rata berat kalus delima hitam tidak homogen sehingga tidak terpenuhi asumsi untuk dilakukan uji variasi ANOVA. Maka, pada pengujian rata-rata berat kalus diuji dengan menggunakan uji *brown-forsythe* dan uji *welch*. Berikut ini adalah tabel ringkasan hasil analisis uji *brown-forsythe* dan uji *welch* pada rata-rata berat kalus terhadap media perlakuan PEG 6000 yang akan ditunjukkan oleh tabel 4.1.

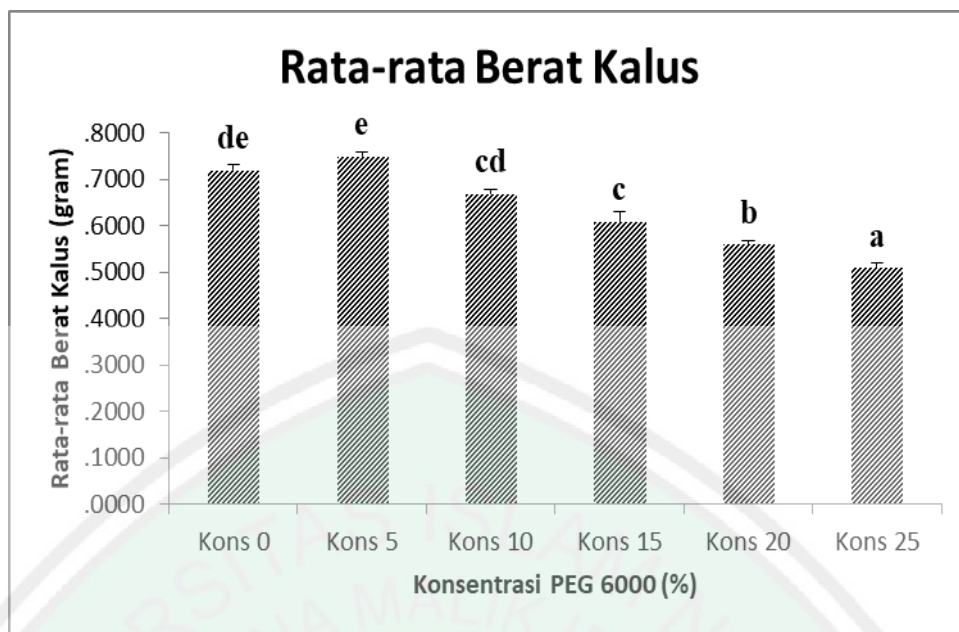
Robust Test of Equality of Means

Table 4.1 Ringkasan ANOVA uji Brown-Forsythe dan uji Welch terhadap pengaruh pemberian konsentrasi PEG terhadap rata-rata berat kalus delima hitam.

	Statistic ^a	df1	df2	Sig.
Welch	78.516	5	8.328	.000
Brown-Forsythe	63.967	5	9.617	.000

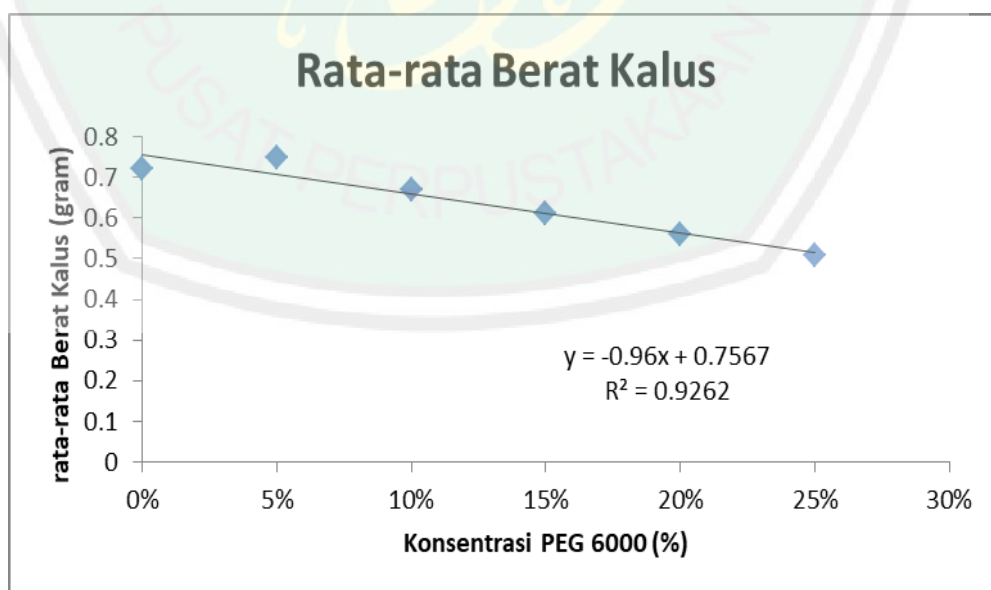
a.Asymtotically F distributed

Hasil pengujian diatas menunjukkan bahwa nilai hasil statistik uji *brown-forsythe* sebanyak 78,516 dan uji *welch* sebanyak 63,967 dengan nilai signifikan sebesar 0,00 (<0,05). Dengan demikian hasil yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa H₀ ditolak dan H₁ diterima yang berarti ada pengaruh perbedaan pemberian media perlakuan PEG 6000 terhadap rata-rata berat kalus pada tanaman delima hitam. Kemudian, dilanjutkan dengan uji lanjut menggunakan uji Games Howell Test yang bertujuan untuk uji t dalam perbandingan kelompok rata-rata kalus pada delima hitam. Hal ini dapat dilihat pada gambar 4.1.



Gambar 4.1 Hasil identifikasi rata-rata berat kalus pada tanaman delima hitam dengan menggunakan konsentrasi PEG 6000 yang berbeda-beda.

Berdasarkan hasil data yang diamati dapat diketahui bahwa konsentrasi PEG 5% merupakan perlakuan yang terbaik dan memberikan pengaruh tidak berbeda nyata terhadap rata-rata berat kalus basah delima hitam. Hal ini dapat dilihat dari grafik rata-rata berat kalus delima gitam yaitu gambar 4.2.



Gambar 4.2 Hasil hubungan korelasi PEG dengan berat kalus delima hitam (gram)

Berat kalus pada tanaman delima hitam dengan diberikan perlakuan perbedaan konsentrasi PEG 6000 memberikan persamaan $y = -0,96x + 0,7567$ dengan determinasi R sebanyak 0,9262 artinya Pemberian perlakuan PEG 6000 menghasilkan pengaruh terhadap berat kalus delima hitam dengan nilai kepercayaan 92%. Dengan gambar grafik diatas dapat disimpulkan bahwa pemberian perbedaan konsentrasi PEG 6000 yang paling optimum berada di konsentrasi PEG 6000 5%.

Berdasarkan hasil data yang diamati dapat diketahui bahwa pada perlakuan kontrol kalus delima hitam menghasilkan rata-rata sekitar 0,7200 gram, kalus dengan perlakuan PEG 6000 5% memberikan hasil rata-rata berat kalus terbaik sekitar 0,7500 gram. Namun, pada pemberian konsentrasi PEG 6000 10-25% mengalami penurunan rata-rata berat kalus secara terus menerus. Dari data diatas menunjukkan bahwa pemberian PEG 5% mampu mempertahankan rata-rata berat kalus dibandingkan dengan perlakuan lain. Hal ini disebabkan karena sel pada kalus mengalami cekaman abiotik dari PEG dengan konsentrasi rendah sehingga sel masih mampu memtoleransi dan memberikan respon massa sel pada kalus menjadi besar.

Menurut Manuhara (2001), kalus yang diberi cekaman PEG dengan konsentrasi rendah mampu mempertahankan diri dengan cara menyimpan air di vakuola sel. Vakuola yang besar memiliki fungsi sebagai penyimpanan air didalam sel sehingga berat basah kalus menjadi naik. Dengan adanya vakuola yang besar mengakibatkan sitoplasma pada tanaman menjadi lapisan yang sangat tipis yang melapisi dinding sel (Fahn, 2011).

Berdasarkan penelitian ini, semakin tinggi konsentrasi PEG 6000 dapat menurunkan rata-rata berat kalus dikarenakan media perlakuan mengalami kekeringan. Menurut Widoretno (2003), semakin tinggi penambahan konsentrasi PEG pada media perlakuan, maka akan semakin sedikit jumlah sel atau jaringan yang akan terbentuk. Hal ini disebabkan karena adanya stress osmosis secara berlebihan sehingga mengalami penurunan rata-rata berat kalus. Hal ini ditambahkan Fitriani (2003), cekaman atau gangguan yang diberikan pada tanaman mengakibatkan nutrisi yang ada didalam media semakin berkurang sehingga pertumbuhan pada kalus mengalami keterlambatan proliferasi sel dan hanya mengalami perkembangan sel sehingga kalus yang terbentuk hanya sedikit. Hal ini terjadi karena nutrisi yang ada di dalam media perlakuan tidak hanya digunakan untuk pertumbuhan kalus tetapi juga digunakan untuk mensintesis metabolit sekunder.

Cekaman PEG pada media perlakuan akan memberikan pengaruh keterbatasan air pada tanaman (Kurwawiyah, 2006). Keterbatasan air pada tanaman mengakibatkan kalus tidak melakukan pembelahan sel secara sempurna sehingga menyebabkan massa sel pada kalus mengalami penurunan secara terus menerus (Lakitan, 2004). PEG 6000 akan melakukan aktivitas pada matrik sub-unit etilena oksida dan mampu mengikat molekul air pada tanaman dengan ikatan hidrogen sehingga pada kondisi tercekam tanaman mengalami ketersediaan air menurun (Suwarsi dan Guhardja, 2005).

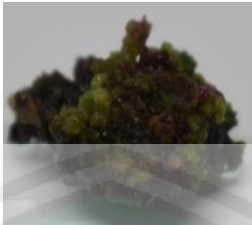
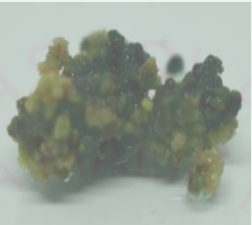


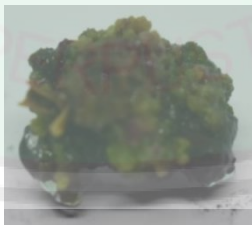
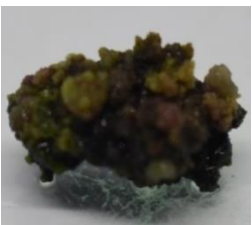
Sel yang diletakkan pada media hipertonik akan kehilangan air dan air tersebut akan berpindah di lingkungan sekitarnya. Hal ini menyebabkan sel pada kalus menjadi mengkerut dan membran plasma tertarik menjauhi dinding

selnya (Plasmolisis). Dengan kurun waktu yang lama sel pada tanaman menjadi mati dan berubah warna menjadi kecoklatan (Campbell, 2002). Hal ini diperkuat oleh penelitian Zulhilmi (2012), Pada kalus batang yang diberi perlakuan PEG 5% memberikan respon pengaruh yang signifikan terhadap rata-rata berat kalus jika dibandingkan dengan media perlakuan PEG sebesar 0%, 1%, 2% dan 3%. PEG 5% memberikan nilai rata-rata berat kalus dari 120 mg (kontrol) menjadi 86,67 mg. Dengan melihat hasil data di atas dapat disimpulkan bahwa semakin tinggi konsentrasi PEG maka nilai rata-rata berat kalus pada setiap tanaman menjadi semakin kecil.

4.2 Pengaruh Pemberian Konsentrasi PEG 6000 terhadap Kualitas Kalus (Warna, Tekstur dan Anatomi) Delima Hitam (*Punica granatum L.*)

Identifikasi warna dan tekstur kalus pada tanaman delima hitam diamati dengan cara visual sehingga dapat mengetahui kalus mana saja yang masih aktif membelah atau sudah mati. Pengamatan pada penelitian ini dilakukan pada hari ke 42 HST dikarenakan pada minggu tersebut kalus mengalami fase stasioner (ukuran dan pertumbuhan tetap). Kalus delima hitam pada pemberian media perlakuan PEG 6000 yang berbeda memberikan pengaruh warna kalus yang bervariasi (tabel 4.2).

Table 2.2 Hasil Pengamatan Pengaruh Pemberian Konsentrasi PEG 6000 terhadap Warna dan Tekstur Kalus Delima Hitam (*Punica granatum L.*) pada hari ke 42 HST

No	Perlakuan	Gambar Pengamatan	Warna Kalus	Tekstur Kalus
1	NAA 0,25 ppm + BAP 1 ppm + PEG 0 %.		Hijau Kecoklatan	Intermediet
2	NAA 0,25 ppm + BAP 1 ppm + PEG 5 %.		Hijau Kekuningan	Intermediet
3	NAA 0,25 ppm + BAP 1 ppm + PEG 10 %.		Hijau Kecoklatan	Intermediet
4	NAA 0,25 ppm + BAP 1 ppm + PEG 15 %.		Hijau Kecoklatan	Kompak
5	NAA 0,25 ppm + BAP 1 ppm + PEG 20 %.		Hijau Kecoklatan	Kompak
6	NAA 0,25 ppm + BAP 1 ppm + PEG 25 %.		Hijau Kecoklatan	Kompak

Penambahan konsentrasi PEG 6000 yang berbeda pada media perlakuan memberikan pengaruh yang signifikan terhadap warna, tekstur dan anatomi kalus delima hitam. Pada awal semua perlakuan kalus memiliki warna hijau. Namun mengalami perubahan warna pada akhir pengamatan di hari ke 42 HST yaitu warna kalus berubah menjadi hijau kecoklatan pada media perlakuan PEG 0%, 10%, 15%, 20% dan 25%, sedangkan pada konsentrasi PEG 5% warna kalusnya berubah warna menjadi hijau kekuningan.

Warna hijau kekuningan pada kalus disebabkan karena kalus mengalami proliferasi sel sehingga akan mempengaruhi kandungan metabolit yang ada didalamnya. Menurut Leupin (2000), Kalus yang berwarna hijau kekuningan menghasilkan kandungan metabolit sekunder yang lebih tinggi dibandingkan dengan kalus yang berwarna coklat. Hal ini terjadi karena adanya aktifitas metabolisme di dalam sel masih berproses dengan baik.

Perubahan warna hijau kekuningan pada kalus delima hitam diduga disebabkan karena kandungan flavonoid yang lebih tinggi dibandingkan dengan senyawa lain. Senyawa flavonoid berfungsi sebagai antioksidan dan zat warna alami. Senyawa flavonoid ini memiliki karakteristik warna yang bermacam-macam diantaranya berwarna ungu, biru, merah dan kuning (Wahyulianingsih, 2012). Menurut Santoso (2006), kalus akan mempertahankan diri ketika tanaman tersebut merasa terancam dan sel akan memberikan respon didalam meningkatkan kandungan flavonoid sebagai antiradikal bebas sehingga warna kalus berubah menjadi kekuningan. Hal ini diperkuat oleh Rahmawati (2007), kalus yang berwarna hijau kekuningan dapat mensistesis senyawa fenol yang berperan sebagai proteksi didalam sel.

Sedangkan warna hijau kecoklatan pada kalus delima hitam disebabkan karena hilangnya air pada sel kalus dan senyawa fenol yang tinggi. Hal ini dipengaruhi oleh adanya cekaman osmotik dari cekaman PEG. Menurut Hayati (2010), Senyawa fenol yang terdapat pada kalus akan bersifat toksik bagi sel jaringan apabila konsentrasi PEG yang diberikan terlalu tinggi. Namun, apabila eksplan memproduksi senyawa fenol yang terbatas maka eksplan masih bisa mentoleransi dan tumbuh dengan baik.

Menurut Arianingsih (2003), cekaman yang diberikan di media perlakuan dapat memberikan respon terhadap perubahan warna kalus dari kalus segar menjadi kalus yang lebih tua (gelap). Semakin tua warna kalus maka dapat mengidentifikasi adanya kandungan metabolit sekunder yang tinggi. Berdasarkan penelitian Mariska (2007), Peningkatan konsentrasi PEG pada kalus nilam mengalami perubahan warna dari putih menjadi kuning hingga kecoklatan. Pencoklatan pada eksplan merupakan bukti dari hilangnya air pada sel kalus yang disebabkan oleh adanya cekaman osmotik.

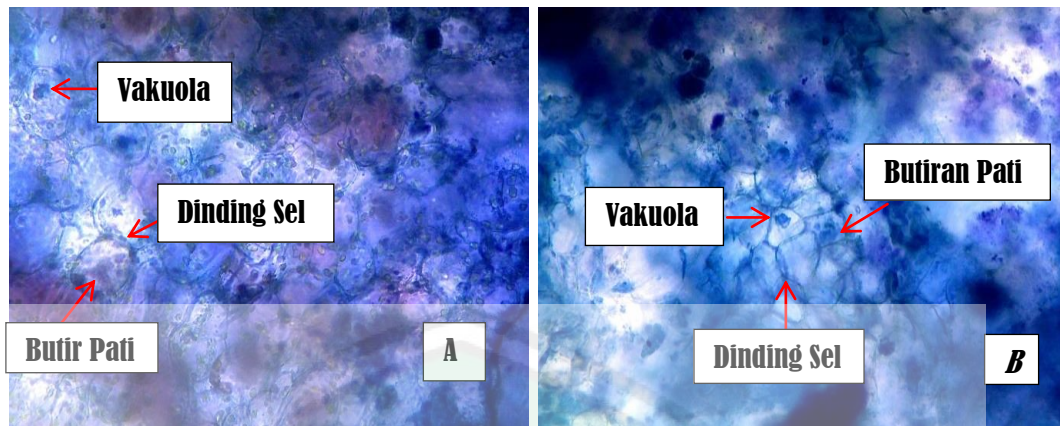
Berdasarkan hasil pengamatan tekstur kalus delima hitam, konsentrasi PEG 6000 yang tinggi memberikan respon pengaruh yang nyata terhadap tekstur kalus. Hal ini terjadi karena adanya cekaman osmosis pada kalus sehingga menyebabkan tanaman bertahan diri dan membentuk tekstur yang intermediet dan kompak. Pada perlakuan PEG 0%, 5% dan 10% memiliki terkstur kalus yang intermediate dan pada perlakuan PEG 15%, 20% dan 25% memiliki tekstur kalus yang kompak. Kalus intermediat yang terbentuk memiliki ciri-ciri lebih mudah dipisahkan dibandingkan dengan kalus yang kompak dan pertumbuhan lebih cepat (Fitriani, 2008). Menurut Indah (2013)

menambahkan bahwa kalus kompak memiliki ciri-ciri sulit dipisahkan, sel-selnya terlihat padat dan inti tidak terlihat serta mengalami pertumbuhan secara lambat.

Menurut Manuhara (2001), Faktor-faktor yang mempengaruhi hasil dari tekstur kalus adalah jenis eksplan, kondisi lingkungan kultur dan zat pengatur tumbuh. Kalus yang bertipe intermediet memiliki massa kalus yang sebagian sel-selnya kompak dan remah (Arianto, 2013). Pada penelitian Sholikhah (2014) tekstur kalus *Centela asiatica* pada media kontrol atau media perlakuan memiliki tekstur yang intermediet dan bagian bawah eksplan kalus memiliki jaringan atau sel yang masih mengandung air didalamnya.

Kalus yang bertekstur kompak dan intermediet menghasilkan kandungan metabolit sekunder lebih tinggi di bandingkan dengan kalus yang bertekstur remah (Manuhara, 2001). Hal ini terjadi karena kalus tersebut masih didalam fase stasioner (batas maksimal didalam pertumbuhan) sehingga kalus mengalami penghambatan pertumbuhan. Sedangkan kalus yang bertekstur remah memiliki masa proliferasi atau pembelahan sel lebih cepat sehingga produksi metabolit sekundernya menurun (Aisyah, 2007).

Berdasarkan hasil pengamatan, anatomi kalus pada metabolit sekunder dapat diamati dengan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x. Hasil pengamatan anatomi kalus delima hitam dapat dilihat pada gambar 4.3



Gambar 4.3 Hasil pengamatan anatomi kalus Delima Hitam dengan menggunakan mikroskop.
 A. Intermediet (PEG 6000 0%, 5% dan 15%) B. Kompak (PEG 6000 15%, 20%, dan 25%)

Pengamatan anatomi kalus delima hitam diamati dengan menggunakan mikroskopik dan mendapat hasil yang berbeda-beda dikarenakan tekstur yang didapat pada media perlakuan PEG bervariasi. Penelitian ini menunjukkan bahwa pada perlakuan PEG (0% (kontrol), 5% dan 10%) memiliki tekstur yang intermediet sehingga sel-selnya terlihat tidak begitu rapat dan berukuran lebih besar, vakuola besar dan mengandung pati. Sedangkan PEG (15%, 20% dan 25%) memiliki kalus yang kompak dan memiliki ciri-ciri anatomi seperti bentuk sel berukuran kecil dan rapat, inti tidak terlihat, vakuola besar dan mengandung butiran pati yang banyak. Menurut Fahn (2011), rongga antar sel dan vakuola yang besar pada kalus dapat digunakan sebagai tempat menyimpan air sehingga kalus ini tergolong kalus metabolit sekunder. Hal ini diperkuat oleh Fitriani (2008) bahwa vakuola yang besar disebabkan karena adanya cekaman osmosis pada kalus sehingga menyebabkan tanaman bertahan diri dan berbentuk tekstur intermediet dan kompak.

Menurut Manuhara (2001) membahas tentang kalus yang bertekstur kompak dan intermediet akan menghasilkan kandungan metabolit sekunder lebih tinggi dibandingkan dengan kalus yang bertekstur remah. Hal ini

ditambahkan oleh (Fahn, 2011), kalus metabolit biasanya memiliki ciri-ciri bentuk anatomi seperti ukuran sel terlihat kecil dan padat sehingga sulit untuk dipisahkan, banyak mengandung pati, sitoplasma padat, dan ukuran vakuola yang relatif lebih besar. Vakuola yang besar memiliki fungsi sebagai tempat penyimpanan air didalam sel, sehingga berat kalus basah menjadi naik. Dengan adanya vakuola yang besar mengakibatkan sitoplasma pada tanaman menjadi lapisan yang sangat tipis yang melapisi dinding sel.

Berdasarkan hasil penelitian Emil (2018) menyatakan bahwa kalus delima hitam dilihat dengan menggunakan mikroskopik dengan perbesaran 400x memberikan ciri-ciri bahwa kalus delima hitam memiliki sel yang padat dan berukuran kecil, vakuola besar, inti tidak terlihat begitu jelas dan banyak mengandung pati didalamnya. Sedangkan secara morfologi kalus delima hitam memiliki ciri-ciri sulit dipisahkan, teksturnya kompak dan warna kalus dominan lebih terang.

4.3 Pengaruh Pemberian Konsentrasi PEG 6000 terhadap Kandungan Flavonoid Kalus Delima Hitam (*Punica granatum L.*)

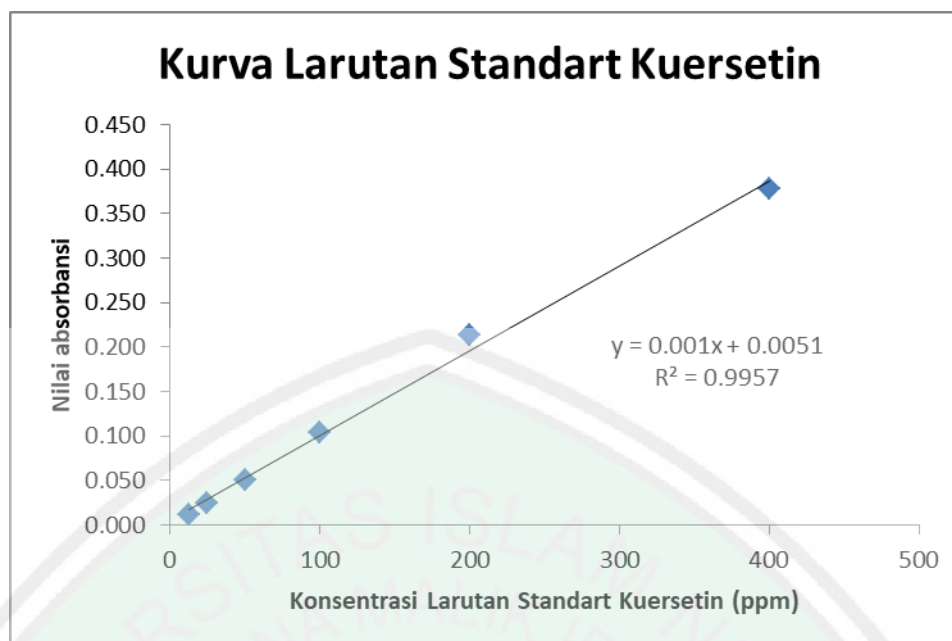
Uji Flavonoid pada kalus delima hitam dilakukan dengan cara kualitatif yaitu menggunakan alat Spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 515 nm. Pada penelitian ini untuk menentukan kadar total flavonoid pada sampel menggunakan larutan standard dengan konsentrasi 0 ppm (blank), 12,5 ppm, 25 ppm, 50 ppm, 100 ppm, 200 ppm dan 400 ppm. Berdasarkan hasil penelitian, senyawa flavonoid pada kalus tanaman delima hitam dapat

terdeteksi pada semua perlakuan PEG 6000 diantaranya yaitu konsentrasi 0%, 5%, 10%, 15%, 20% dan 25% mengandung kandungan senyawa flavonoid.

Larutan standart yang digunakan pada penelitian ini yaitu kuersetin. Kuersetin memiliki fungsi sebagai larutan standart dikarenakan kuersetin merupakan senyawa flavonoid berupa golongan flavonol yang di dalamnya terdapat gugus keto pada C-4 dan gugus hidroksil pada C3 atau C5 yang bertetangaan dari flavon ke flavonol (Azizah dan Salamah, 2013). Hasil grafik hubungan antara konsentrasi kuersetin (ppm) dengan nilai absorbansi kuersetin dapat di lihat pada tabel 4.3.

.Table 4.3 Hasil dari hubungan konsentrasi kuersetin (ppm) dengan nilai absorbansi kuersetin pada panjang gelombang 515 nm

No.	Konsentrasi (ppm)	Nilai Absorbansi (y)
1.	0	0,000
2.	12,5	0,011
3.	25	0,025
4.	50	0,051
5.	100	0,104
6.	200	0,213
7.	400	0,378



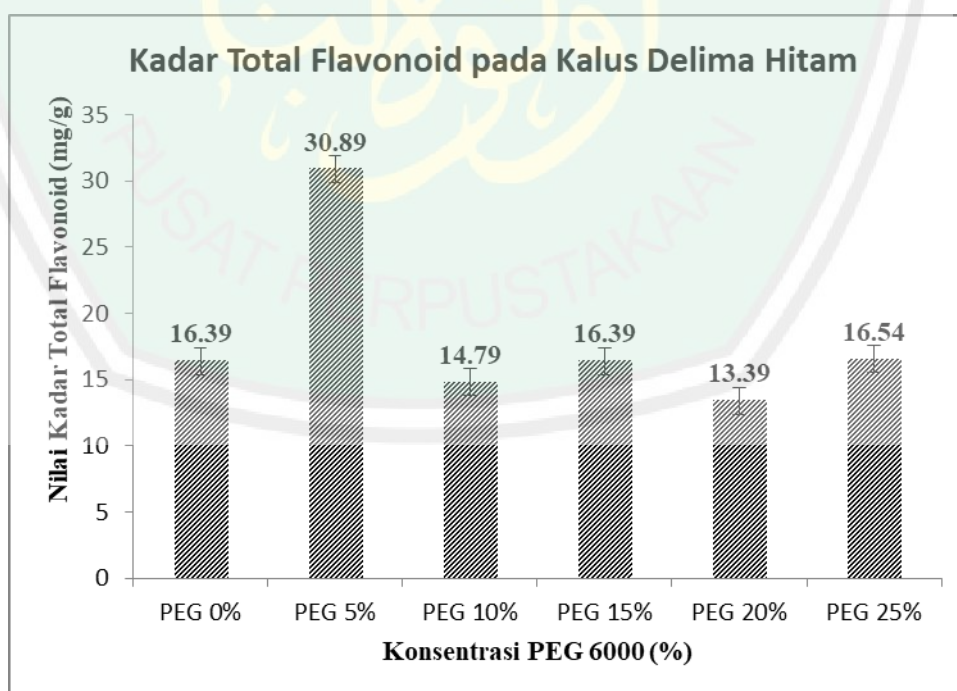
Gambar 4.4 Grafik Kurva Larutan Standart Kuersetin

Hasil dari pengukuran kurva kalibrasi (4.4) dapat disimpulkan bahwa semakin tinggi nilai konsentrasi larutan standart (ppm) yang dipakai maka nilai absorbansi yang di dapat semakin besar. Pembuatan kurva kalibrasi ini berfungsi untuk menghubungkan konsentrasi (ppm) dengan nilai absorbansi dan sebagai pembanding untuk menentukan kadar senyawa flavonoid total. Pada penelitian ini diperoleh data persamaan regresi linear yaitu $y = 0,001x - 0,0051$ dengan koefisien korelasinya $R = 0.9957$. Persamaan regresi linear ini memiliki fungsi untuk menghitung kadar total flavonoid dalam ekstrak tanaman. Menurut Hermita (2004), Koefisien korelasi yang lebih dari dari 0,98 maka telah memenuhi kriteria penerimaan. Kadar total flavonoid (x) yang dihitung dengan menggunakan persamaan regresi $y = ax + b$.

Pada penelitian ini, kalus delima hitam menghasilkan kandungan flavonoid total yang berbeda-beda di setiap media perlakuan PEG 6000. Menurut Razavizadeh (2005), Media padat yang diberi perlakuan PEG

bertujuan untuk menciptakan kondisi tanaman menjadi tercekam dan menurunkan potensial air pada semua perlakuan. Potensial air yang rendah pada kalus mampu meningkatkan kandungan metabolit sekunder.

Data dari hasil kadar total flavonoid diuji dengan menggunakan ANOVA tidak berdistribusi normal sehingga jalan solusinya diuji dengan menggunakan SPSS *Kruskal Wallis* dan diuji lanjut menggunakan *Man Whitney*. Uji *Kruskal Wallis* menghasilkan signifikan sebesar 0,178 ($P > 0,05$) sehingga berdistribusi normal. Langkah selanjutnya, diuji dengan menggunakan *Man Whitney* menghasilkan nilai signifikan sebesar 1 ($P > 0,05$) sehingga dapat disimpulkan bahwa tidak ada perbedaan nyata terhadap kadar total flavonoid kalus delima hitam pada setiap perlakuan. Hasil identifikasi kandungan kadar total flavonoid pada kalus delima hitam dapat dilihat di gambar 4.5.



Gambar 4.5 Hasil identifikasi kandungan kadar total flavonoid pada kalus delima hitam

Berdasarkan pengamatan diatas, peningkatan kandungan metabolit sekunder (flavonoid) disebabkan karena adanya mekanisme pertahanan diri didalam kalus delima hitam. Dari data diatas, hasil kandungan flavonoid yang tertinggi pada kalus tanaman delima hitam di media perlakuan PEG 5% sebesar 30,89 mg/g. Semakin tinggi konsentrasi PEG (10%, 15%, 20% dan 25%) yang diberikan pada media padat mampu menurunkan senyawa flavonoid yang ada didalamnya. Hal ini terjadi karena kalus delima hitam mengalami kekurangan air akibat sel mengalami stress abiotik dari cekaman PEG sehingga tanaman mengalami kekeringan. Sel pada kalus akan mengkerut dan membran plasma menjauhi dinding sel (Plasmolisis) (Campbell, 2002). Dengan adanya aktivitas tersebut, kalus menghasilkan glikolisis yang rendah dan Acetyl CoA tidak membentuk fenilalanin ammonia liase (FAL) dengan sempurna sehingga metabolisme primer pada kalus tidak memenuhi syarat untuk membentuk senyawa flavonoid. Menurut Rijke (2005), Banyaknya senyawa flavonoid pada tanaman disebabkan karena adanya tingkat hidrosilasi atau struktur dari glikosilasi.

Menurut Hartanti (2013), pemberian PEG pada media perlakuan mampu memberikan pengaruh terhadap kalus sehingga kalus mengalami stress osmosis. Semakin tinggi konsentrasi PEG mengakibatkan kalus kekurangan air dan mengalami tekanan turgor pada dinding sel. Hal ini dapat diindikasikan bahwa plasmolisis merupakan signal bagi membran plasma untuk mengaktifkan protein osmoprotektan yang berperan sebagai pendorong di dalam mensintesis ABA (Asam absisat). Terbentuknya ABA dapat digunakan sebagai stimulus protein osmoprotektan untuk mentolerasi kondisi tanaman

pada saat kekeringan. Protein osmoprotektan akan berinteraksi dengan sistem reseptor pada membran plasma sehingga menyebabkan Ca^{2+} interseluler berperan sebagai *second messenger*. *Second messenger* memiliki peran untuk menghambat air keluar dari sel sehingga memiliki fungsi sebagai induksi transkripsi dan translasi pada enzim-enzim yang bersangkutan dengan jalur metabolit sekunder.

Flavonoid yang tinggi pada kalus dapat didukung dengan melihat ciri-ciri morfologi dan anatomi kalus. Semakin tinggi konsentrasi PEG yang diberikan warna kalus menjadi hijau kecoklatan, bertekstur kompak dan memiliki sel yang padat, butiran pati yang banyak serta vakuola yang besar. Hal ini disebabkan karena kalus mengalami stress osmosis sehingga mengakibatkan tanaman melakukan proteksi diri melalui penurunan berat kalus dan warna kalus dari terang menjadi semakin gelap. Menurut Riata (2010) menyatakan bahwa kalus akan melakukan mekanisme pertahanan diri ketika ada rangsangan dari luar sehingga menyebabkan kondisi tanaman tidak normal. Sel tumbuhan akan merespon rangsangan tersebut dengan mekanisme pertahanan diri sehingga menghasilkan zat fitoaleksin. Hal ini dikarenakan PEG 6000 dianggap sebagai sel radikal bebas sehingga kalus membentuk pertahanan diri dengan cara meningkatkan antosianin sebagai anti radikal bebas sehingga kalus berwarna hijau kekuningan – hijau kecoklatan.

Peningkatan metabolit sekunder juga disebabkan karena adanya mekanisme pertahanan dari kalus dan pengaruh dari ZPT. Zat pengatur tumbuh akan memberikan pengaruh pada ekspresi yang terkait metabolit sekunder khususnya pada jumlah dan aktifitas didalam biosintesa suatu senyawa

(Rahmawati, 2007). Pada penelitian Umrotin (2018), Kalus delima hitam diinduksi dengan menggunakan NAA 0,25 ppm dan BAP 1 ppm mampu memberikan respon ciri-ciri morfologi dan anatomi pada kalus metabolit sekunder. Santoso (2001) menyatakan bahwa pemberian hormon auksin dapat meningkatkan enzim fenilalanin ammonia liase (FAL). Menurut Hardiyanto (2004), Interaksi NAA dengan sintesis flavonoid mampu meningkatkan kerja enzim fenilalanin ammonia liase (FAL) dan menghasilkan sinamat. Pembentukan senyawa flavonoid ini dari malonil CoA sehingga diduga hormon auksin mampu meningkatkan jumlah kadar total flavonoid pada tanaman.

Hal ini di perkuat oleh Taiz dan Zeiger (2002), Metabolit sekunder yang tergolong senyawa fenolik dapat di produksi oleh tanaman ketika tanaman mengalami proses jalur phenylalanine lyase di eliminasi molekul ammonia dari asam sikamat. Enzim phenylalanine lyase (PAL) ini merupakan enzim yang dapat memproduksi metabolit sekunder khususnya senyawa flavonoid pada tanaman di jalur asam sikamat.

4.4 Perspektif Islam tentang Hasil Penelitian Pengaruh Pemberian PEG 6000 terhadap Kalus Delima Hitam (*Punica granatum L.*)

Tumbuhan merupakan makhluk hidup yang diciptakan oleh Allah SWT dengan tujuan tertentu dan tidak hanya secara kebetulan sehingga memiliki nilai guna masing-masing. Salah satu manfaat tanaman bagi manusia ialah sebagai bahan dasar obat tradisional, kosmetik, dan tanaman hias. Firman Allah SWT didalam Surah Asy-Syu'araa' ayat 7 yang berbunyi:

أَو لَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ

Artinya: “ Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapakah banyaknya kami tumbuhkan di bumi itu berbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik?” (QS. Asy-syuaraa/26:7).

Ayat tersebut menjelaskan bahwa Allah SWT menciptakan beranekaragam tanaman yang ada di bumi ini dengan tanaman yang baik. Menurut Al Qurtubi (2009), Tanaman yang baik adalah tanaman yang memiliki warna, bentuk serta kandungan metabolit sekunder yang tinggi sehingga dapat dimanfaatkan sebagai bahan dasar obat tradisional. Salah satu kategori tanaman yang baik ialah tanaman Delima Hitam. Delima hitam merupakan salah satu tanaman yang dimanfaatkan sebagai bahan dasar obat tradisional dikarenakan diakui memiliki khasiat yang sangat banyak terhadap kesehatan tubuh manusia

Manusia diciptakan sebagai khalifah di bumi ini memiliki peran untuk mengolah sumber daya alam dengan baik sehingga memiliki kewajiban untuk melestarikan. Dengan Allah SWT menciptakan tanaman yang baik di bumi ini, maka manusia dapat memanfaatkan tanaman sebagai pertahanan untuk hidup. Salah satu diantaranya dimanfaatkan sebagai bahan pangan, bahan bangunan serta obat-obatan. Hal ini telah dijelaskan dalam firman Allah pada surah Ali Imran ayat 191 yang berbunyi

الذِينَ يَذْكُرُونَ اللَّهَ قِيَامًا وَقَعُودًا وَعَلَىٰ جُنُوبِهِمْ وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ السَّمَاوَاتِ وَالْأَرْضِ رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ

هَذَا بِلَا طَلَابٍ لَنَا فَمَنْ نَكْفُرُكَ فَقَاتِلْنَا بِالنَّارِ

Artinya: “(yaitu) orang-orang yang mengingat Allah sambil berdiri, duduk atau dalam keadaan berbaring dan mereka memikirkan tentang penciptaan langit dan bumi (seraya berkata): “Ya Tuhan Kami, Tiadalah Engkau yang menciptakan ini dengan sia-sia, Maha Suci

Engkau, Maka periharalah Kami dari siksa neraka” (QS. Ali Imran/ 3:191).

Ayat diatas menjelaskan bahwa manusia yang berakal diwajibkan untuk memikirkan segala sesuatu yang diciptakan oleh Allah dengan cara mengingatNya dengan kondisi apapun. Manusia telah ditetapkan sebagai khalifah atau pemimpin yang berakal sehingga manusia harus terbiasa memanfaatkan akal pikirannya untuk memikirkan makhluk yang diciptakanNya.

Dengan adanya perintah Allah bahwa manusia yang berakal disuruh memikirkan segala sesuatu yang ada di bumi ini dan mengungkapkan rahasia yang ada pada Al-qur’an. Salah satu upaya yang dapat digunakan untuk meningkatkan kandungan metabolit sekunder pada tanaman ialah melalui teknik *In Vitro*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui mukjizat didalam Alqur’an tentang manfaat buah delima sebagai buah surga. Allah SWT berfirman didalam surah Ar-Rahman ayat 68 yang berbunyi:

فيهما فاكهة ونخل ورمان

Artinya: “Didalam keduanya (ada macam-macam) buah-buahan dan kurma serta delima” (Q.S Ar-Rahman/55:68)

Berdasarkan ayat diatas menjelaskan bahwa Allah SWT menumbuhkan segala macam tumbuh-tumbuhan yang baik dan memiliki manfaat yang sangat banyak untuk manusia dan lingkungan disekitarnya. Misalnya, buah-buahan (Kurma dan Delima) yang memiliki faktor keunggulan dan keutamaan tersendiri. Menurut Quraish Shihab (2009), buah delima mampu meminimalisir pengaruh zat asam dalam urine dan darah yang disebabkan karena adanya kandungan zat asam lemonik. Buah delima juga mengandung zat gula yang

bersifat mudah diserap sehingga menghasilkan energi didalam tubuh. Didalam Al-qur'an juga telah dijelaskan bahwa buah delima merupakan buah surge yang memiliki kelezatan dan kenikmatan yang dapat dinikmati oleh penghuni surge. Namun, di bumi ini juga diciptakan buah delima yang memiliki manfaat yang sangat banyak untuk di manfaatkan manusia sebagai bahan dasar obat tradisional.

Berdasarkan hasil data yang diperoleh pada penelitian ini, pada perlakuan PEG 5% memberikan respon rata-rata berat kalus yang lebih optimal dibandingkan dengan perlakuan lain sebesar 0,7500 gram dan kandungan total flavonoid sebesar 30,89 mg/g. Sedangkan dari segi kualitas kalus delima hitam pada perlakuan PEG 5% bertekstur intermediet dan berwarna hijau kekuningan. Konsentrasi elisitor yang terlalu tinggi pada media tanam menyebabkan kandungan metabolit sekundernya semakin menurun sehingga harus menemukan konsentrasi yang tepat. Firman Allah SWT di dalam Alqur'an Surat Al-Qamar ayat 49 yang berbunyi:

انا كل شيء خلقته بقدر

Artinya: "Sesungguhnya segala sesuatu kami ciptakan dengan qadar (ukuran, aturan)" (QS. Al-Qomar/ 54:49).

Ayat di atas menjelaskan bahwa Allah menciptakan segala sesuatu sesuai dengan aturan yang pasti dan ukuran yang sudah ditentukan. Menurut Mulyasar (2007) menyatakan bahwa segala sesuatu yang sudah terjadi atau akan terjadi di alam semesta ini pasti berdasarkan takdirNya. Sehingga dalam penelitian ini, penambahan elisitor pada media kalus delima hitam akan memberikan respon atau hasil yang berdeda-beda pada setiap parameter

Kandungan metabolit sekunder pada tanaman delima hitam khususnya senyawa flavonoid memiliki manfaat yang sangat banyak bagi tubuh manusia diantaranya sebagai antibakteri, antiinflamasi, antidiabetes, antimikroba, antipenuaan dan antikanker. Meningkatkan kandungan metabolit sekunder yang ada pada kalus delima hitam memberikan manfaat yang sangat banyak diantaranya sebagai upaya konservasi untuk mencegah adanya kepunahan dan tidak membutuhkan waktu yang lama di dalam memproduksi metabolit sekunder secara massal dengan jumlah yang banyak. Semua ini merupakan bukti dari kebesaran dan kekuasaan Allah SWT serta menunjukkan adanya tahapan-tahapan kehidupan pada setiap tanaman.



BAB V PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang sudah dilakukan tentang “Peningkatan Kandungan Flavonoid Kalus Delima Hitam (*Punica granatum L.*) dengan Penambahan *Polyethylene Glycol* (PEG) 6000 melalui Teknik *In Vitro*”, maka dapat disimpulkan bahwa:

1. Konsentrasi PEG 5% memberikan respon terhadap rata-rata berat kalus yang terbaik dibandingkan dengan media perlakuan yang lain sebesar 0,7500 gram.
2. Warna kalus di konsentrasi PEG 5% berwarna hijau kekuningan, bertekstur intermediet sehingga ketika dilihat dengan menggunakan mikroskop sel-selnya terlihat tidak begitu rapat dan berukuran lebih besar, vakuola besar dan mengandung pati.
3. Konsentrasi PEG 5% memberikan respon yang paling optimum di dalam meningkatkan kandungan flavonoid kalus delima hitam sebanyak 30,89 mg/g.

5.2 Saran

1. Penelitian ini perlu dilakukan penelitian lanjutan mengenai kandungan flavonoid kalus delima hitam (*Punica granatum L.*) dengan menggunakan uji LCMS/GCMS.
2. Penelitian ini perlu dilakukan uji PEG pada konsentrasi yang lebih rendah.

DAFTAR PUSTAKA

- Agustin, M. A. 2015. Pengaruh Berbagai Konsentrasi PEG (*Polyethilen Glycol*) 6000 Terhadap Kualitas dan Kuantitas Kalus Serta Uji Kualitas Metabolis Sekunder Vernodalin pada Kalus Daun Afrika (*Vernonia amygdalina*). *Skripsi*. Malang: Uin Malang.
- Ahad, S., Syed, T., Tauseeff, A.M., Irshad and Ahmad N. 2018. *Anticoccidial activity of fruit peel of Punica granatum L.* Vol 116. No 78-83.
- Aisyah, S. I. 2007. Induksi Kalus Embriogenik Pada Kultur In Vitro Propogation of *Stevia rebaudiana*. *Pak. Journal Botani*. 42 (4): 2827-2837.
- Al maraghi, dan Ahmad M. 1993. *Tafsir Al-Maraghi, (Terjemahan)*, Juz 15. Semarang: Toha Putra.
- Al-Qurtubi, S.I. 2009. *Tafsir Al-Qurthibi*. Jakarta Selatan: Pustaka Azzam
- Anand, S. 2010. Varios Approach for Secondary Metabolite Production Throught Plant Tissue Culture. *Pharmacia*. 1 (1). 1-7.
- Andaryani, S. 2010. Kajian Penggunaan Berbagai Konsentrasi BAP dan 2,4-D terhadap Induksi Kalus Jarak Pagar (*Jatropha curcas L.*) secara *In Vitro*. *Skripsi*. Surakarta: Faperta Universitas Sebelas Maret.
- Andriani, V. 2015. *Karakteristik Anatomi dan Aktivitas Antioksidan Delima (Punica granatum L. Var)*. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada.
- Anggarwulan, E.S. 2001. *Fisiologi Tumbuhan*. Surrakarta: UNS Press.
- An-Najjar, Prof. Dr. Zaghlul. 2011. *Sains Dalam Hadis: Mengungkap Fakta Ilmiah dari Kemukjizatan Hadis Nabi*. Jakarta : Amzah.
- Anwar, N. 2007. Pengaruh Media Multiplikasi terhadap Pembentukan Akar pada Tunas In Vitro Nenas (*Ananas comosos (L.) Merr*) cv. Smooth Cayenne di Media Perakaran (*Skripsi*). Bogor: Departemen Budidaya Pertanian Fakultas Pertanian Institut Pertanian Bogor.
- Arianingsih, Ika, Sholichatun dan Anggarwulan E. 2003. Pertumbuhan Kalus dan Produksi Antarkuonin Mengkudu (*Morinda citrofolia*) pada Media Murashige-Skoog (MS) dengan Penambahan Ion Ca^{2+} dan Cu^{2+} . *Jurnal Bioinformasi* 1(2) : 39-43.

- Arianto, B. dan M.U. Bustamil. 2013. Induksi Kalus Dua Klon Kakao (*Theobroma cacao L.*) Unggul Sulawesi Pada Berbagai Konsentrasi 2,4-D Secara *In Vitro*. *E. J. Agrotekbis*. 1 (3).
- Aziz, A. 2006. *Pengantar Kebutuhan Dasar Manusia Aplikasi Konsep dan Proses Keperawatan*. Jakarta: Salemba Medika.
- Azizah, B. dan Salamah, N. 2013. Standarisasi Parameter Spesifik dan Perbandingan Kadar Kurkumin Ekstrak Etanol dan Ekstrak Terpurifikasi Rimpang Kunyit. *Jurnal Ilmiah Kefarmasian*. Vol 1. No. 3. 21-30.
- Bahera. 2012. UV-Vis Spectrophotometric Method Development and Validation of Assay of Paracetamol Tablet Formulation. *Journal Anal Bional Techniques*. ISSN: 2155-9872.
- Bakhti, A. M., Sriwidodo B., Indriyanti, W., dan Maelaningsih, Firdha, S. 2016. Formulasi Krim Antihiperpigmentasi Ekstrak Kulit Buah Delima (*Punica granatum L. Var*). *IJPST*. 3 (1).
- Basiri, Shadi. 2013. Evaluation of Antioxidant and Antiradical Properties of Promogranate (*Punica granatum L.*) Seed and Defatted Seed Extracts. *Journal Food Sci Technol*. 1 (4).
- Bassett J. 2013. *Buku Ajar Vogel Kimia Analisis Kuantitatif Anorganik*. Jakarta: EGC.
- Basyier, Abu Umar. 2011. *Kedokteran Nabi Antara Realita & Kebohongan*. Surabaya: Shafa Publika.
- Bektas, N. dan Nilgun, O. 2007. Antioxidant Activity of *Punica Granatum L. Var* (Pomogranate) Flowers. *Toxicology letters*.
- Bonyanpour, A. dan Morteza, K. 2013. Callus Induction and Plant Regeneration in *Punica granatum L.* 'Nana' from Leaf Explant. *Journal of Central European Agriculture*. Vol.4, No.3. 928 – 936.
- Budiyanti, R. 2012. Pertumbuhan Kalus Ibu Tangkai Daun Purwoceng (*Pimpinella alpine*) dalam Medium MS (Murashige dan Skoog) dengan Pemberian 2,4-D dan BAP. *Skripsi*. Universitas Diponegoro.
- Bulgakov, V. P., G. K. Tehernoded, N. P. Mischenko, Yu. N. Shkryl, V. P. Glazunov, S.A. Fedoreyev dan Yu. N. Zhuravlev. 2003. In crease in Anthraquinone Content in *Rubia cordifolia* Cell Transformed by rol Genes Does Not Involve Activation of the NADPH Oxidase Signaling Pathway. *Biochemistry*. 68 (7). 795-801.

- Campbell, N.A., Reece, J.B dan Mitchell, L.G. 2002. *Biologi Jilid I. Edisi Ke Lima*. Jakarta : Erlangga.
- Chattopadhyay, L. 2004. Turmeric and Curcumin: Biological Action and Medical Applications. *Current Science*. 87 (1). 44-53.
- Chauhan, R.D. dan Kanwar, K. 2011. Biotechnological Advances in Pomogranate (*Punica granatum L.*). *In Vitro Cell. Dev. Bio.- Plant*. 48. 579-594.
- Darusman, L.K. 2003. *Good Agricultural Practices (GAP) Dalam Budidaya Tanaman Obat Sebagai Upaya Menghasilkan Simplisia Terstandar*. Jakarta : Fakultas Farmasi Universitas Pancasila.
- David. 2010. *Buku Ajar untuk Mahasiswa Farmasi dan Praktisi Kimia Farmasi Edisi 2*. Jakarta: Buku Kedokteran EGC.
- Davies dan Schwinn. 2006. *Plant Hormones*. London: Kluwer Academic Publisher.
- Deepika, R. dan Kanwar, K. 2012. Biotechnological Advances in Promogranate (*Punica Granatum L. Var*). *In Vitro Cell. Dev. Biomol*. Vol. 48. 579 – 594.
- Depkes RI. 2008. *Warta Eksplor Obat Traditional Indonesia*. Jakarta: Kementrian Perdagangan Republik Indonesia. DOI: 10.1016/j.toxlet.2007.05.183.
- Duangporn, P. dan Pemjet, S. 2009. Effect of Auxin and Cytokinin on Phyllantushol A Production by Callus Culture of *Phyllanthus acidus* Skeels. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci*. Vol. 1, No.1. 53 – 63.
- Dzajuli, M. 2010. Pengaruh Cekaman Kekeringan terhadap Pertumbuhan dan Beberapa Karakter Morfo-fisiologis Tanaman Nilam. *Bul. Litro*. 21 (1).
- Ehsanpour, A.A., and R. Razavizadeh. 2005. Effect of UV-C on Drought Tolerance of Alfafa (*Medicago sativa*) Callus. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*. 1 (2). 107 – 110.
- Elaleem, H.G., Albasheer, A.A., dan Elaleem, K.G. 2016. Phytochemical Screening and Antibacterial Activity of *Punica granatum* Fruit Rind Extracts. *Global Journal of Medical Plant Research*. 4 (4).
- Elbatonony, M.M., El-feky, A.M ., Hemdan, B.A dan El-liethy, M.A . 2018. Assessment of the antimicrobial activity of the lipoidal and pigment extracts of *Punica granatum L.* leaves. *Jurnal Elsevier*. Vol.2 No. 1. 1 – 6.

- Ernawati, A. 1992. *Produksi Senyawa-Senyawa Metabolit Sekunder Dengan Kultur In-vitro Tanaman*. Hal 169 – 208 Dalam Wattimena, G.A. 1992. *Bioteknologi Tanaman*. Bogor : ITB.
- Fakhri, A. 2010. Kultur In Vitro Tanaman Theobroma cacao dengan Variasi Polyethylene Glycol (PEG) 6000 dan Potensinya Untuk Memproduksi Metabolit Sekunder Katekin. *Skripsi*. Jurusan Kimia. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Padang: Universitas Andalas.
- Faria, A. dan Conceicao. 2011. The Bioactivity of Pomegranate: Impact on Health and Disease. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Vol. 51. 626 – 634.
- Fitriani N, L. 2013. Pengaruh Penambahan ZPT 2,4-D dan PEG (*Polyethylene Glycol*) 6000 pada Media MS (Murashige & Skoog) untuk Produksi Metabolit Sekunder pada Kultur Kalus Stevia (*Skripsi*). Malang : Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Fitriani, B.N. 2003. *Pertumbuhan Tunas Purwoceng (Pimpinella alpine k.) pada perlakuan prokondisi dengan variasi konsentrasi thidiazuron*. Skripsi Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Sebelas Maret Surakarta.
- George E.F and de Klerk G-J. 2008. The Components of Plant Tissue Culture Media I : Macro and Micro-Nutrients. *Plant Propagation by Tissue Culture, 3rd Edition*. Vol 1 : 175 – 204.
- Gritter, R. J. J. M. Bobbit dan A. E. Schwarting. 1991. *Pengantar Kromatografi. Terjemahan Introduction to Chromatography oleh K. Padwaminata dan I. Soediro*. Bandung: ITB Press.
- Gunawan, L. W. 1995. *Teknik Kultur In Vitro Tumbuhan*. Bogor: Pusat Antar.
- Harahap, F. 2011. *Fisiologi Tumbuhan : Suatu Pengantar*. Medan: Animed Press.
- Hardiyanto, A, Solichatun dan W Mudyantini. 2004. Pengaruh Variasi Konsentrasi Asam Naftalen Asetat terhadap Pertumbuhan dan Kandungan Flavonoid Kalus Daun Dewa (*Gynura procumbens L.*) *Jurnal Sains*. 7(2):51-64.
- Harjanti, R. 2013. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Penangkap Radikal Bebas 2,2-Difenil-1 Pikrilhidrazil dari Daun Kedondong (*Spondias dulcis*). Yogyakarta: Tesis Universitas Gadjah Mada.
- Harsodjo W.S. 2003. Isolasi dan Identifikasi Flavonoid pada Daun Katu (*Sauropus androgynous (L) Merr*). *Makara Sains*. 7 (2).

- Hartanti, M.F., Nurhidayati. T dan Muryono M. 2013. Budidaya Tanaman Tembakau (*Nicotiana tabacum L. Var*) pada Cekaman Kekeringan Polyethylene Glycol (PEG) Secara *In Vitro*. <https://www.google.com/digilib.its.ac.id/ITSUndergraduate-18903-paper305304.pdf>(diakses tgl 15 April 2013).
- Hasan, A. M., Redha, A. A., dan Mandeel, Q. 2018. Phytochemical Investigations of Pomegranate (*Punica granatum*) Rind and Aril Extracts and Their Antioxidant, Antidiabetic and Antibacterial Activity. *Nat Prod Chem Res, an Open Access Journal*. 6 (4).
- Hayati, S.K., Yulita, N., dan Nintya S. 2010. Induksi Kalus dari Hipokotil Alfalfal (*Medicago sativa L.*) Secara *In Vitro* dengan Penambahan *Benzyl Amino Purine* (BAP) dan *a-Napthalene Acetic Acid* (NAA). *BIOMA*. 12 (1). 6-12.
- Hendaryono, D.P & Dini E. 1994. *Teknik Kultur Jaringan Pengenalan dan Petunjuk Perbanyakkan Tanaman Secara Vegetatif-Modern*. Yogyakarta: Kanisius.
- Ibnu Katsir. 2002. *Tejamahan Tafsir Ibnu Katsir. Ter. Bahrun Abu Bakar LC. Juz 1. Cet. II*. Bandung : Sinar Baru Algesindo.
- Indah, N.P., dan Ernavitalini, D. 2013. Induksi Kalus Daun Nyamplung (*Calophyllum inophyllum Linn.*) pada Beberapa Konsentrasi 6 Benzylaminopirune (BAP) dan 2,4-Dichlorophenoxyacetic (2,4-D). *Jurnal sains dan semi pomits*. Vol. 2 No. 1.
- Jahromi, S. B. 2018. *Punica granatum* (Promogranate) Activity in Health Promotionn and Cancer Prevention. *Oncology Reviews*. 12.
- Jannah, R., Suwirman dan Noly, Z. A. 2016. Pengaruh Pemberian Elisator Cu²⁺ terhadap Kalus *Artemisia vulgaris* dalam Upaya Penyediaan Antermisinin Sebagai Antimalaria. *Pross Sem Nas Masy Biodiv Indon*. 2 (2).
- Jayesh K.C and Kumar, R. 2004. Crossability in pomegranate (*Punica granatum L.*). *Indian J Hortic*. 2 (1). 176 – 179.
- Jeevarathinam, A dan P.Muthulakshmi. 2017. Evaluation of Phytochemicals and Antioxidant Potential of Pomegranate Peel. *International Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Research*. Vol 8 (3).
- Juan, Lee. 2010. Oil Price movements and stock markets revisited: A case of sector stock price indexes in the G-7 countries. *Journal of Energi Economics*. 34: 1284-1300.

- Karasu, C., Cumaoglu, A., Gurpinar, A. R., Kartal, M., Kovacicova, L., Milackova, I., dan Stefek, M. 2012. Aldose Reductase Inhibitory Activity and Antioxidant Capacity of Pomegranate Extracts. *Journal interdiscip Toxicol.* 5 (1).
- Katuuk. 1989. *Teknik Kultur Jaringan dalam Mikropropogasi Tanaman Jurusan Budidaya Pertanian*. Yogyakarta : Fapetra UGM.
- Kelly, S. G. 2011. Quercetin. *Alternative Medicine Review. Journal Kesehatan.* 16 (2). 123-137.
- Khan, S. A. 2009. The Role of Promogranate (*Punica Granatum L. Var*) in Colon Cancer. *Pak. J. Pharm. Sci.* Vol. 22, No. 3. 346 – 348.
- Khasanah, N. 2011. *Kandungan Buah-buahan Dalam Al-qur'an: Buah Tin (Ficus Carica L), Zaitun (Olea europea L), Delima (Punica granatum L. Var), Anggur (Vitis vinivera L.) dan Kurma (Phoenix dactylifera L.) untuk Kesehatan*. Semarang: IAIN Walisongo.
- Kholisa. 2018. Potensi Ekstrak Buah Delima Merah (*Punica granatum L. Var*) terhadap Penurunan Jumlah Koloni Bakteri *Streptococcus mutans*. Jember: Universitas Jember.
- Khopkar, S. M. 2010. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Jakarta: UI-Press.
- Kristanti, A. N. 2008. *Buku Ajar Fitokimia*. Surabaya: Universitas Erlangga Press.
- Kumar P, Rane Z. A dan Bhaskar, Anusha. 2012. Phytochemical Evalution by GC-MS and *in vitro* Antioxidant Activity of *Punica granatum* Fruit Rind Extract. *Journal Of Chmical and Pharmaceutical Research.* 4 (6).
- Kumar, N dan Dr. Neeraj. 2018. Study On Physic-chemical and Antioxidant Properties of Promogranate Peel. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry.* 7 (3).
- Kumar, R., Jakhar, ML., Verma, R dan Jat, H.R. 2017. Delima (*Punica Granatum L. Var*) Mikropropogasi. *Int. Journal Purr. App. Biosci.* Vol. 5 No. 5. 1138 – 1149.
- Lakitan. 2004. *Fisiologi Pertumbuhan dan Perkembangan Tanaman*. Jakarta: PT. Raja Grafindo Persada.
- Lestari, S. 2013. Pengaruh Jenis Eksplan Dan Konsentrasi IBA Terhadap Pertumbuhan Dan Kadar Metabolit Sekunder (Stigmasteron dan

- Sitosterol) Kalus Purwoceng (*Pimpinella alpine Molk.*) Pada Media MS. *Skripsi*. Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Uin Malang.
- Leuner, C and Dresman, J. 2000. Improvign Drug Solubility for Oral Delivery Using Solid Dispersion. *Eur. Journal. Pharm. Biopharm.* 50 : 47-60.
- Leupin, R.E., Leupin M., Charles E., Karl H.E and Without B. 2000. Compact Callus Induction and Plant Regeneration of a Non-Flowering Vetiver from Java. *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* 62: 115-123.
- Li Y et al. 2006. Evaluation of antioxidant properties og pomegranate peel extract incomparision with pomegranate pulp extract. *Food Chemistry* 96:254-260.
- Lutviana, A., Manuhara, S.W. dan Wida, E.S. 2012. Pengaruh Zat Pengatur Tumbuh dan NaCl terhadap Pertumbuhan Kalus Kotiledon Tanaman Bunga Matahari (*Helianthus annus L.*). *Skripsi*. Universitas Airlangga.
- Madhawati. 2012. *Si Cantik Delima (Punica granatum) Dengan Sejuta Manfaat Antioksidan sebagai bahan Alternatif Alami Tampil Sehat dan Awet Muda*. Malang: Universitas Negeri Malang.
- Mandang, D., Pangemanan and Trisnaamijaya. 2013. Hubungan perilaku Merokok dan Kejadian Angina Pektoris Tidak Stabil. <http://ejournal.unsrat.ac.id>.
- Manjula, R., dan mythilli, T. 2012. Improved Phytochemical Production Using Biotic and Abiotic Elicitor in *Marcilea quadrifolia*. *International Journal Curr. Scinces.* 1(2). 98-101.
- Mansour, A., Khaled, A. Ben., B. Lachiheb., M. Abid., Kh. Bachar dan A. Ferchichi. 2013. Phenolic Compounds, Antioxidant, and Antibacterial Activities of Peel Extract from Tunisian Pomogranate. *Jurnal Agr. Sci. Tech.* 15.
- Manuhara, Y.S.W. 2001. Regresi Tanaman Sawi (*Brassica juncea L.*) melalui Teknik Kultur Jaringan. *Jurnal MIPA.* 6 (2): 127-130.
- Marchi, Livia B., Monteiro, Antonio R.G., Mikcha, Jane M.G., Santos, Adriele R., Chinellato, Mariana M., Marques, Diego R., Dacome, Antonio S. dan Costa, Silvio C. 2015. Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Capacity of Pomgranate Peel Extract (*Punica granatum L.*) Under Different Drying Temperatures. *Chemical Engineering Transactions.* 44 (1).

- Mariska, I., dan Sukmadjaja, D. 2003. *Perbanyakkan Bibit Abaka Melalui Kultur Jaringan*. Bogor: Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian.
- Matsuoka, H dan Hinata, K. 1979. NAA- Induced Organogenesis and Embryogenesis in Hypocotyl Callus of *Solanum melongena L.* *Journal of Experimental Botany*. 30 (1).
- Mejia, U.A dan Palou, A.L. 2010. Granada (*Punica Granatum L. Var*): Una Fuente De Antioxidantes De Interes Actual. *Temas Selectos de Ingeniera alimentos*. Vol. 1 No. 4. 64 – 73.
- Mumpuni, K. E., Herawati, S dan Fatchur, R. 2014. The Potential of Local Plants as a Source of Learning Biology. *Seminar Nasional XI Pendidikan Biology FKIP UNS*.
- Muryanti, S. dan Anggarwulan, E. 2005. Pertumbuhan dan Produksi Reserpin Kalus Pule Pandak (*Raufolevia serpetin (L) Bentham ex. Kurz*) pada Pemberian Metil Jasmonat Secara In Vitro. *Journal Bioteknologi*. 22 (2).
- Namdeo, A.G. 2007. Plant Cell Elicitation for Production of Secondary Metabolites: A Review. *Pharmacognosy Review*. 1 (1). 69-79.
- Nazza. 2013. Induksi kalus pegagan (*Centela asiatica*) pada media MS dengan penambahan zat pengatur tumbuh 2,4-D yang dikombinasikan dengan air kelapa. *Skripsi*. UIN Malang.
- Neldawati., Ratnawulan dan Gusnedi. 2013. Analisis Nilai Absorbansi dalam Penentuan Kadar Flavonoid Berbagai Jenis Daun Tanaman Obat. Padang: Pillar Physics. 2 (2). 136-143.
- Ningsih, I. Y. 2014. Pengaruh Elisitor Biotik dan Abiotik pada Produksi Flavonoid Melalui Kultur Jaringan Tanaman. *Pharmacy*. 11 (2).
- Oci Y.M & Dewi, K.K. 2014. *Khasiat Ajaib Delima*. Jakarta: Padi.
- Parti. 2004. Identifikasi Senyawa Isoflavon Pada Kalus Yang Berasal Dari Dua Macam Eksplan Kedelai (*Glycinemax Merr*). *Skripsi*. Jakarta : Agro Media Pustaka.
- Purwantini, I dan Subagus, W. 2017. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Antijamur (*Candida albicans*) dari Kulit Buah Delima (*Punica Granatum L. Var*). *Majalah Farmasi Indonesia*.
- Purwanto, A. W. 2008. *Pesona Jenmanii*. Yogyakarta: Kanisius.

- Rahmat, R. 2007. *Delima*. Yogyakarta: Kanistus.
- Rahmawati, P.D. 2007. Pengaruh konsentrasi 2,4-D terhadap pertumbuhan dan Kandungan Senyawa Isoflavon daidzein dan genistein dari kalus kedelai (*Glycine max L. Merr*). *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Malang.
- Rajan, S., S. Mahalaksmi., V. M. Deepa., K. Sathya, S. Shajitha dan T. Thirunalasundari. 2011. Antioxidant Potentials of *Punica granatum* Fruit Rind Extracts. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. Vol. 3, No. 3. ISSN: 0975-1491.
- Rao, R. 2002. Biotechnological Production of Phytopharmaceuticals. *Journal Biochem Molekuler Biomolekul Biophys*. 4 (1). 73-102.
- Razavizadeh. R, Ehsanpour AA. 2005. Optimization of *in vitro* propagation of Rosa hybrid L. Cultivar black red. American-Eurasian. *J. Agric & Environ. Sci*. 3(1) : 96-99.
- Riata, R. 2010. *Elisitasi*. [http: Elisitasi dalam Kultur Jaringan. Html](http://Elisitasi dalam Kultur Jaringan. Html). Diakses tanggal 11 Januari 2012.
- Rijke, E. 2005. Trace-level Determination of Flavonoids and Their Conjugates. *Journal Farmasi*. 2 (1). 145-157.
- Rohman, S. N. 2007. Penggunaan BAP dan 2,4-D Terhadap Induksi Kalus In Vitro Iles-iles (*Amorpophalusmuelleri blume*). *Skripsi*. IPB Bogor.
- Rusmaputeri, F. 2018. Daya Hambat Ekstrak Buah Delima Merah (*Punica granatum Linn*) terhadap Pertumbuhan *Streptococcus sanguis*. Jember: Universitas Jember.
- Ruswaningsih, F. 2007. Pengaruh Konsentrasi Ammonium Nitrat dan BAP Terhadap Pertumbuhan Eksplan Pucuk *Artemisia annua L.* pada Kultur In Vitro. *Skripsi*. Fakultas Pertanian UNS, Surakarta.
- Sabrina, G.A., Sukanto dan Probosari, N. 2015. Daya Antibakteri Fraksi *n-butanol* Kulit Buah Delima Putih (*Granati fructusortex*) terhadap *Streptococcus mutans* (*Antibacterial Activity of White Pomegranate Pericarp (Granati fructus cortex) n-butanol Fraction against Streptococcus mutans*). *Jurnal Pustaka Kesehatan*. Vol. 3 No. 3. 536 -541.
- Sadik, Mahmoud S. dan Asker, Mohsen M.S. 2014. Antioxidant and Antitumor Activities of Pomegranate (*Punica granatum*) Peel Extracts. *World Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2 (11).

- Santoso, U & F. Nursandi. 2002. *Kultur In Vitro Tanaman*. Malang: UMM Press.
- Sayyid, A. B. M. 2011. *Terapi Herbal dan Pengobatan Cara Nabi Saw*. Jakarta: Penebar Plus.
- Senoaji, S.W. 2016. Uji Kandungan Senyawa Fenolik pada Ekstrak Kalus dan Ekstrak Daun Sambiloto (*Andrographis paniculata* Ness). (Skripsi). Yogyakarta : Universitas Islam Negeri Sunan Kalijaga.
- Setyorini, M. 2018. Pengaruh Pemberian PEG (Polyethylen Glycol) 6000 terhadap Induksi Kalus dan Kandungan Metabolit Sekunder Tanaman Adas (*Foeniculum vulgare* Mill.). Skripsi. Malang : Uin Malang.
- Shadab, K., Anjum, P. dan Bhise, K.S. 2017. Antioxidant Activity of Pomegranate Peel Powder. *Journal of Drug Delivery & Therapeutics*. 7 (2). 81 – 84.
- Sharma, P., McClees, S.F. dan Afaq, F. 2017. Pomegranate for Prevention and Treatment of Cancer: An Update. *Molecules*. 22 (1).
- Shiban, M.S., Al-Otaibi, M.M. dan Al-Zoreky, N.S. 2012. Antioxidant Activity of Pomegranate (*Punica granatum* L.) Fruit Peels. *Food and Nutrition Sciences*. 3 (1).
- Shihab, Q. 2010. *Membumikan Al-qur'an, Fungsi dan Peran Wahyu dalam Kehidupan Manusia*. Bandung: Mizan.
- Shilpa, K., Varun, K., dan Lakshmi, B.S. 2010. An Alternate Method of Natural Drug Production: Elciting Secondary Metabolite Production Using Plant Cell Culture. *Journal of Plants Sciences*. 5 (3). 222-247.
- Silvia, W., Kiki M., dan Syafhir, L. 2016. Pengujian Pengaruh Perbedaan Metode Ekstraksi terhadap Aktivitas Antioksidan Kulit Buah Delima (*Punica granatum* L. Var) serta Penetapan Kadar Flavonoid Total. *Prossiding Farmasi*. ISSN: 2460-6472.
- Sitorus, E.N., Hastuti, E.D., dan Setiari, N. 2011. Induksi Kalus Binahong (*Basellarubra* L.) secara *In Vitro* pada Media Murashige dan Skoog dengan Konsentrasi Sukrosa yang Berbeda. *BIOMA*. 13 (1).
- Sjahid, L.R. 2008. Isolasi dan Identifikasi Flavonoid Dari Daun Dewandaru (*Eungenia uniflora* L.) Skripsi. Surakarta: Universitas Muhammadiyah Surakarta.

- Smith, A. et al, 2000. The Scala of Occupational Stress : The Bristol Stress and Healt at Work Study. Health and Safety Axecutive. U. K.
- Sudarmadji, S. 2003. Penggunaan Benzil Amino Purine pada Pertumbuhan Kalus Kapas Secara *In Vitro*. Buletin Teknik Pertanian. 8 (1).
- Sudjadi dan Abdul R. 2012. *Analisis Farmasi*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Sudrajad, H. Saryanto. 2012. Pengaruh Penambahan Sitokinin pada Senyawa Flavoid Kalus (*Echnacea purpurea L.*). 1 (2). 102-108.
- Sugiyarto, L dan Kuswandi, P.C. 2014. Pengaruh 2,4-Diklorofenoksiasetat (2,4-D) dan Benzyl Aminopurin (BAP) terhadap Pertumbuhan Kalus Daun Binahong (*Anredera cordifolia L.*) serta Analisis Kandungan Flavonoid Total. *Jurnal Farmasi*. 2 (1). 123-142.
- Sumathy. S, R., Sankaranarayanan., P. B., J. Ramachandran., M.V. dan M. Deecaraman. 2013. Antioxidant and antihemolytic activity of flavonoid Extract From Fruit Peel of *Punica granatum*. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 6 (2).
- Sumiasri, N. 2006. Pertumbuhan Biji Eboni Pada Pemakaian Berbagai Dosis Hormon Indole Butyric Acid (IBA). *Jurnal Dinamika Pertanian*. XXI (2). 127-131.
- Sutini., W., Purwantoro, D.A., dan Indrayanto, G. 2017. Teknologi Kultur *In Vitro* Tanaman Untuk Menghasilkan Metabolit Sekunder dan Aplikasi Di Bidang Farmasi. *Prosiding Seminar Nasional III*. 2 (4).
- Syahid, Sitti F. 2008. Keragaman Morfologi, Pertumbuhan, Produksi, Mutu dan Fitokimia Keladi Tikus (*Typonium flagelliforme Lodd.*) Blume Asal Variasi Somaklonal. *Jurnal Littri*. 14 (3).
- Taiz, L. dan Zeiger, E. 2002. *Plant Physiology. Third edition*. USA: Sinauer.
- Thulashiram, T.D. 2013. Pengaruh Sitokinin di Kombinasu dengan Auxins pada Mikropropogasi Efisiensi Delima (*Punica Granatum L. Var*). Jabalpur: Jawaharial Nehru Krishi Vishwa Vidyalaya.
- Umrotin, E. 2018. Pengaruh Penambahan Zat Pengatur Tumbuh NAA DAN BAP terhadap Induksi Kalus Kompak Delima Hitam (*Punica Granatum L. Var*) Secara *In Vitro*. *Skripsi*. Malang: Uin Malang.
- Wardani, D.P., Sholichatun, S., dan Ahmad D. 2004. Pertumbuhan dan Produksi Saponin Kultur Kalus *Talinum poniculatum Gaertn.* Pada Variasi

Penambahan Asam 2,4-Diklorofenoksi Asetat (2,4-D) dan Kinetin. *Bioinformasi*. Vol. 2(3). 35 – 43.

Wattimena, G.A. 1992. *Bioteknologi Tanaman*. Bogor : ITB.

Whetherel, D. F. 1976. *Pengantar Propogasi Tanaman Secara In Vitro*. Terjemahan: D. Gunawan. IKIP Semarang Press.

Widhiasih, P.R., Jirna, I.N. dan Dhyanaputri, I.S. 2017. Potensi Ekstrak Kulit Buah Delima terhadap Pertumbuhan *Candida albicans* Secara *In Vitro*. ISSN. Vol. 5 No. 2, 77 – 82.

Widoretno, S. 2003. Pengaruh Penambahan Nitrat dan Cu Terhadap Konsentrasi Cu dalam Organ *Arachis hypogea L*. *BioSMART*. 5 (2): 94-97.

Wink, M. 2010. Introduction: Biochemistry, Physiology and Ecological Functions of Secondary Metabolites. *Annual Plant Reviews*. 1-10.

Yasuda, T., Yoko F., dan Tadashi Y. 1985. Embryogenic Callus Induction from *Coffea arabica* Leaf Explants by Benzyladenine. *Plant and Cell Physiology*. Vol 26 (3).

Yuliarti, N. 2010. *Kultur In Vitro Tanaman*. Yogyakarta: Andi Offeset.

Yulinda, E. 2010. Kultur In Vitro Tanaman *Cetella asiatica* dengan Beberapa Konsentrasi *Polyethylene glycol* (PEG) 6000 dan Potensinya untuk Produksi Metabolit Sekunder triterpenoid. Padang : Universitas Andalas Padang.

Yuniarti, T. 2008. *Ensiklopedia Tanaman Obat Tradisional*. Cetakan Pertama. Yogyakarta: MedPress. 35 – 38.

Yurwono, T. 2006. *Bioteknologi Pertanian*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.

Yusnawan, E. 2016. The diversity of secondary metabolites in Indonesian soybean genotypes. *Bio-diversitas*. 17 (2). 704-710.

Yusnita. 2003. *Kultur In Vitro* (Cara Memperbanyak Tanaman Secara Efisien). Jakarta: Agromedia Pustaka.

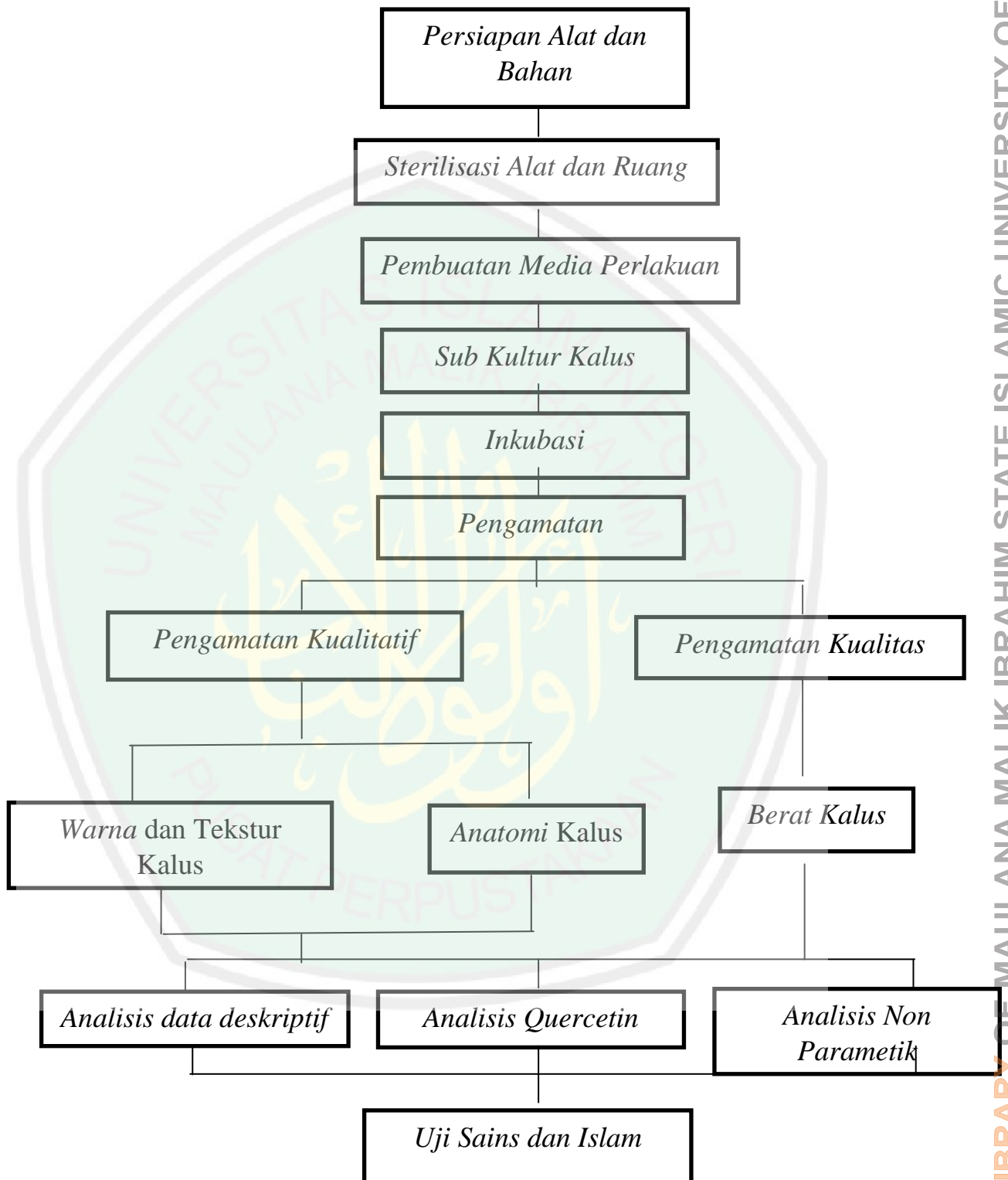
Zulhilmi., S dan Surya, N.W. 2012. The Growth and Qualitative Test of Secondary Metabolite Content of *Sphilanthes acmella Murr*. With

Addition of PEG untuk Menginduksi Cekaman Kekeringan. *Journal Biologi Universitas Anndalas*. 1 (1).

Zulkarnain. 2009. *Kultur Jaringan Tanaman: Solusi Perbanyakan Tanaman Budidaya*. Jakarta: Bumi Aksara.



LAMPIRAN

Lampiran 1 Alur Kerja Penelitian

Lampiran 2 Komposisi Bahan Kimia pada Media MS (mg/l)

Unsur Makro	(mg/l)	Unsur Mikro	(mg/l)	Vitamin	(mg/l)
KNO ₃	1900	MnSO ₄ ·4H ₂ O	16.9	Myo-inositol	100
NH ₄ NO ₃	1650	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6	Tiamin HCL	0.1
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	H ₃ BO ₃	6.2	Piridoxin HCL	0.5
NH ₄ H ₂ PO ₄	-	KI	0.83	Asam nicotin	0.5
CaCl ₂ ·2H ₂ O	332.2	CuSO ₄ ·7H ₂ O	0.025	Gliasin	2
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	-	NAM ₀ O ₃	-	Biotin	-
KCl	-	NAM ₀ O ₄ ·2H ₂ O	0.25	Karbohidrat	(mg/l)
KH ₂ PO ₄	170	C ₀ Cl ₂ ·6H ₂ O	0.25	Sukrosa	3000
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	Fe ₂ (SO ₄) ₃	-	Agar-agar	800
Na ₂ SO ₄	-	Fe ₂ SO ₄ ·6H ₂ O	27.8	pH	5.6-5.8
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	-	Na ₂ EDTA	37.7		

Lampiran 3 Perhitungan dan Pengambilan Larutan Stok Hormon

Perhitungan didalam pembuatan larutan stok hormon 100 ppm dalam 100 ml aquadest ialah sebagai berikut:

- a. Larutan stok hormon NAA 100 ppm dalam 100 ml aquadest.

$$\text{Larutan stok hormon NAA} 100 \text{ ppm} = \frac{100 \text{ mg}}{1 \text{ L}} = \frac{100 \text{ mg}}{1000 \text{ ml}} = \frac{10 \text{ mg}}{100 \text{ ml}}$$

- b. Larutan stok hormon NAA 100 ppm dalam 100 ml aquadest.

$$\text{Larutan stok hormon NAA} 100 \text{ ppm} = \frac{100 \text{ mg}}{1 \text{ L}} = \frac{100 \text{ mg}}{1000 \text{ ml}} = \frac{10 \text{ mg}}{100 \text{ ml}}$$

Perhitungan stok hormon untuk pembuatan media perlakuan

1. Perlakuan pemberian hormon NAA sebanyak 0,25 ppm

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$100 \text{ ppm} \times V1 = 0,25 \text{ ppm} \times 50 \text{ ml}$$

$$V1 = \frac{0,25 \text{ ppm} \times 50 \text{ ml}}{100 \text{ ppm}}$$

$$V1 = 0,125 \text{ ml}$$

2. Perlakuan pemberian hormon BAP sebanyak 1 ppm

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$100 \text{ ppm} \times V1 = 1 \text{ ppm} \times 50 \text{ ml}$$

$$V1 = \frac{1 \text{ ppm} \times 50 \text{ ml}}{100 \text{ ppm}}$$

$$V1 = 0,5 \text{ ml}$$

Lampiran 4 Perhitungan Konsentrasi PEG (%)

$$\text{Rumus PEG} = \frac{100 \times 100 \% = 100 \%}{100}$$

$$\text{PEG 0\%} = \frac{0}{100} \times 100 \% = 0 \%$$

$$\text{PEG 5\%} = \frac{5}{100} \times 100 \% = 5 \%$$

$$\text{PEG 10\%} = \frac{10}{100} \times 100 \% = 10 \%$$

$$\text{PEG 15\%} = \frac{15}{100} \times 100 \% = 15 \%$$

$$\text{PEG 20\%} = \frac{20}{100} \times 100 \% = 20 \%$$

$$\text{PEG 25\%} = \frac{25}{100} \times 100 \% = 25 \%$$

Lampiran 5 Data Hasil Rata-rata Berat Kalus Tanaman Delima Hitam (gram).

Perlakuan	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Ulangan 4	Jumlah	Rata-rata
PEG 0%	0.72 g	0.70 g	0.75 g	0.71 g	2.88 g	0.72 g
PEG 5%	0.73 g	0.74 g	0.77 g	0.76 g	3.00 g	0.75 g
PEG 10%	0.66 g	0.69 g	0.67 g	0.66 g	2.64 g	0.67 g
PEG 15%	0.57 g	0.58 g	0.65 g	0.64 g	2.44 g	0.61 g
PEG 20%	0.54 g	0.56 g	0.56 g	0.58 g	2.24 g	0.56 g
PEG 25%	0.52 g	0.50 g	0.49 g	0.53 g	0.53 g	0.51 g

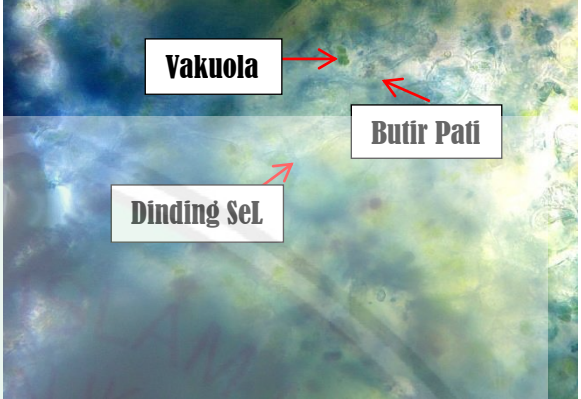

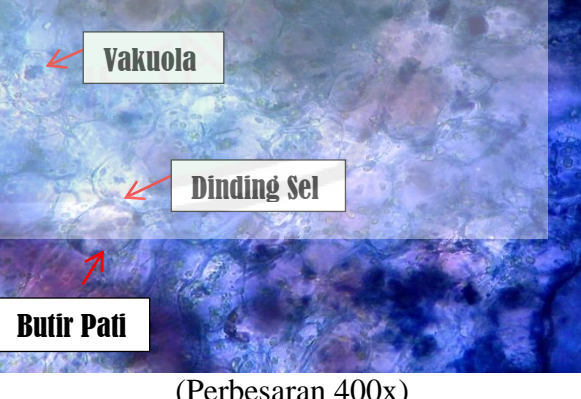
Lampiran 6 Warna Kalus Delima Hitam pada Media Perlakuan Konsentrasi PEG 6000 Yang Berbeda-beda.

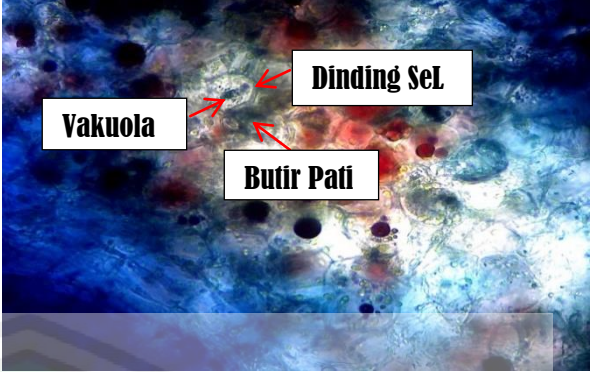
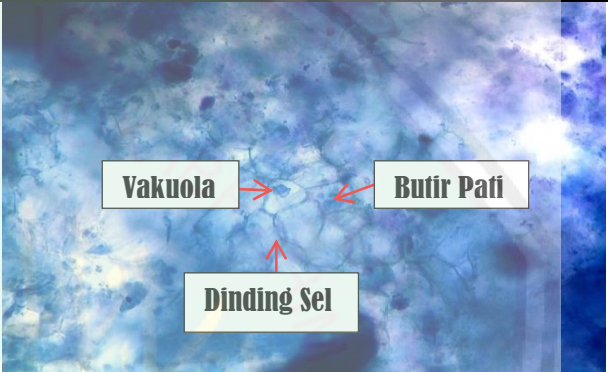

Perlakuan	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Ulangan 4
PEG 0%	Hijau Kecoklatan	Hijau Kecoklatan	Hijau Kecoklatan	Hijau Kecoklatan
PEG 5%	Hijau Kekuningan	Hijau Kekuningan	Hijau Kekuningan	Hijau Kekuningan
PEG 10%	Hijau Kecoklatan	Hijau Kecoklatan	Hijau Kecoklatan	Hijau Kecoklatan
PEG 15%	Hijau Kecoklatan	Hijau Kecoklatan	Hijau Kecoklatan	Hijau Kecoklatan
PEG 20%	Hijau Kecoklatan	Hijau Kecoklatan	Hijau Kecoklatan	Hijau Kecoklatan
PEG 25%	Hijau Kecoklatan	Hijau Kecoklatan	Hijau Kecoklatan	Hijau Kecoklatan

Lampiran 7 Tekstur Kalus Delima Hitam pada Media Perlakuan Konsentrasi PEG 6000 Yang Berbeda-beda.

Perlakuan	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Ulangan 4
PEG 0%	Intermediet	Intermediet	Intermediet	Intermediet
PEG 5%	Intermediet	Intermediet	Intermediet	Intermediet
PEG 10%	Intermediet	Intermediet	Intermediet	Intermediet
PEG 15%	Kompak	Kompak	Kompak	Kompak
PEG 20%	Kompak	Kompak	Kompak	Kompak
PEG 25%	Kompak	Kompak	Kompak	Kompak

Lampiran 8 Hasil Identifikasi Kalus Delima Hitam dengan Menggunakan Mikroskop sebesar 400x.

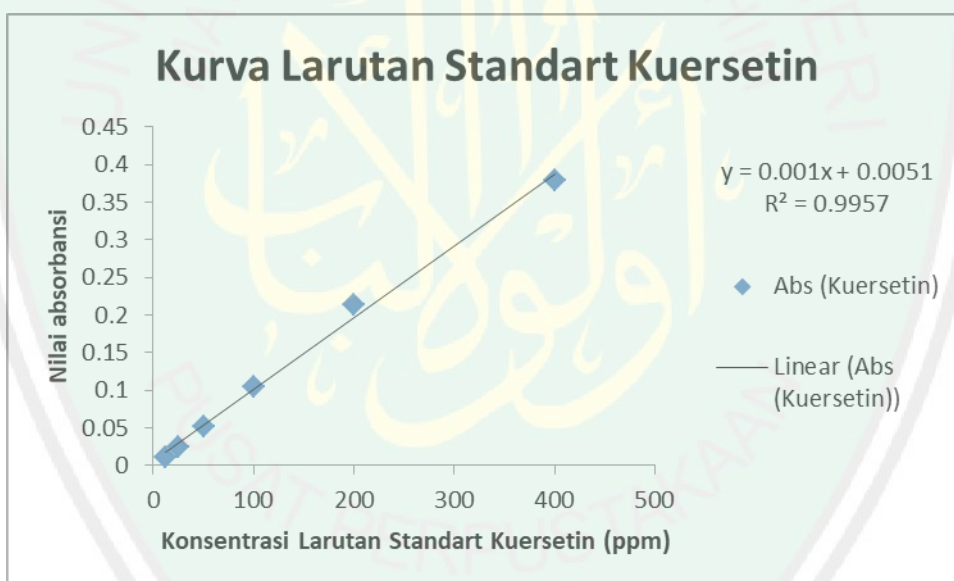
No.	Perlakuan	Gambar Pengamatan
1	NAA 0,25 ppm + BAP 1 ppm + PEG 0 %.	 <p>(Perbesaran 400x)</p>
2	NAA 0,25 ppm + BAP 1 ppm + PEG 5 %.	 <p>(Perbesaran 400x)</p>
3	NAA 0,25 ppm + BAP 1 ppm + PEG 10 %.	 <p>(Perbesaran 400x)</p>

4	NAA 0,25 ppm + BAP 1 ppm + PEG 15 %.	 <p>(Perbesaran 400x)</p>
5	NAA 0,25 ppm + BAP 1 ppm + PEG 20 %.	 <p>(Perbesaran 400x)</p>
6	NAA 0,25 ppm + BAP 1 ppm + PEG 25 %.	 <p>(Perbesaran 400x)</p>

Lampiran 9 Perhitungan manual hasil penelitian kandungan total flavonoid pada kalus delima hitam

Nilai Absorbansi Kurva Larutan Kuersetin

No.	Konsentrasi (ppm)	Nilai Absorbansi
1.	0	0,000
2.	12,5	0,011
3.	25	0,025
4.	50	0,051
5.	100	0,104
6.	200	0,213
7.	400	0,378



Gambar 1. Kurva Larutan Standart Kuersetin

Perhitungan kadar total flavonoid pada kalus delima hitam ialah sebagai berikut:

Perlakuan	Ulangan 1	Ulangan 2	Jumlah	Rata-rata
PEG 0%	0.160	0.178	0.338	0.169
PEG 5%	0.364	0.264	0.628	0.314
PEG 10%	0.146	0.160	0.306	0.153

PEG 15%	0.175	0.163	0.338	0.169
PEG 20%	0.114	0.164	0.278	0.139
PEG 25%	0.172	0.162	0.341	0.171

Salah satu contoh cara perhitungan kadar total flavonoid ialah sebagai berikut:

PEG (0%) = Nilai absorbansinya 0,160 dan 0,178 dengan jumlah sebesar 0,338 dan memiliki rata-rata sebesar 0,169.

Rumus :

$$Y = a x + b$$

$$(Y = 0,001 x + 0,0051)$$

$$0,169 = 0,001 x + 0,0051$$

$$0,169 - 0,0051 = 0,001 x$$

$$0,169 - 0,0051 = x$$

$$\frac{0,169 - 0,0051}{0,001}$$

$$163,9 \text{ mg/L} = x$$

$$\text{Kadar Flavonoid Total (\%)} = \frac{C \times V}{M}$$

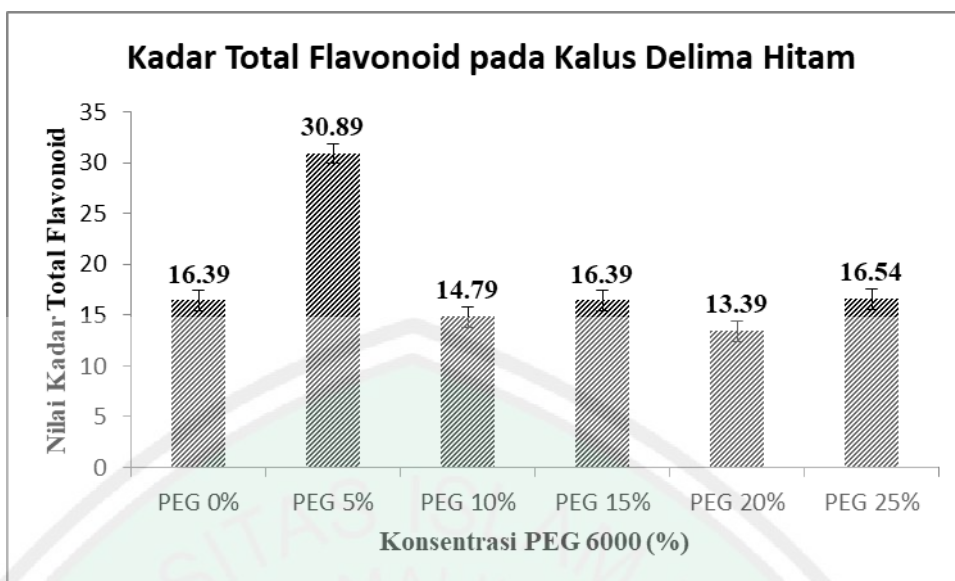
$$= \frac{163,9 \text{ mg/L} \times 0,05 \text{ L}}{0,50 \text{ g}}$$

$$= 16,39 \text{ mg/L}$$

$$= 0,01639 \text{ g QE/g Ekstrak}$$

$$= 0,01639 \text{ g QE/g Ekstrak} \times 100 \%$$

$$= 1,639 \%$$



Gambar 2. Kadar Total Flavonoid pada Kalus Delima Hitam

Lampiran 10 Perhitungan SPSS Hasil Rata-rata Berat Kalus Delima Hitam

Uji Normalitas

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Unstandardized Residual
N		24
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	.0000000
	Std. Deviation	.03138356
Most Extreme Differences	Absolute	.083
	Positive	.076
	Negative	-.083
Test Statistic		.083
Asymp. Sig. (2-tailed)		.200 ^{c,d}

- a. Test distribution is Normal.
- b. Calculated from data.
- c. Lilliefors Significance Correction.
- d. This is a lower bound of the true significance.

Descriptives

Hasil

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					Kons 0	4		
Kons 5	4	.7500	.01826	.00913	.7209	.7791	.73	.77
Kons 10	4	.6700	.01414	.00707	.6475	.6925	.66	.69
Kons 15	4	.6100	.04082	.02041	.5450	.6750	.57	.65
Kons 20	4	.5600	.01633	.00816	.5340	.5860	.54	.58
Kons 25	4	.5100	.01826	.00913	.4809	.5391	.49	.53
Total	24	.6367	.08943	.01825	.5989	.6744	.49	.77

Uji Homogenitas dengan Menggunakan Welch & Brown-Forsythe

Robust Tests of Equality of Means

Hasil

	Statistic ^a	df1	df2	Sig.
Welch	78.516	5	8.328	.000
Brown-Forsythe	63.967	5	9.617	.000

a. Asymptotically F distributed.

Uji Lanjut dengan Menggunakan *Games Howell*

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Hasil

	(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tamhane	Kons 0	Kons 5	-.03000	.01414	.711	-.0971	.0371
		Kons 10	.05000	.01291	.153	-.0159	.1159
		Kons 15	.11000	.02309	.092	-.0188	.2388
		Kons 20	.16000*	.01354	.001	.0941	.2259
		Kons 25	.21000*	.01414	.000	.1429	.2771
	Kons 5	Kons 0	.03000	.01414	.711	-.0371	.0971
		Kons 10	.08000*	.01155	.009	.0242	.1358
		Kons 15	.14000*	.02236	.043	.0056	.2744
		Kons 20	.19000*	.01225	.000	.1324	.2476
		Kons 25	.24000*	.01291	.000	.1796	.3004

Kons 10	Kons 0	-.05000*	.01291	.153	-.1159	.0159	
	Kons 5	-.08000*	.01155	.009	-.1358	-.0242	
	Kons 15	.06000	.02160	.568	-.0841	.2041	
	Kons 20	.11000*	.01080	.001	.0589	.1611	
	Kons 25	.16000*	.01155	.000	.1042	.2158	
Kons 15	Kons 0	-.11000	.02309	.092	-.2388	.0188	
	Kons 5	-.14000*	.02236	.043	-.2744	-.0056	
	Kons 10	-.06000	.02160	.568	-.2041	.0841	
	Kons 20	.05000	.02198	.742	-.0886	.1886	
	Kons 25	.10000	.02236	.142	-.0344	.2344	
Kons 20	Kons 0	-.16000*	.01354	.001	-.2259	-.0941	
	Kons 5	-.19000*	.01225	.000	-.2476	-.1324	
	Kons 10	-.11000*	.01080	.001	-.1611	-.0589	
	Kons 15	-.05000	.02198	.742	-.1886	.0886	
	Kons 25	.05000	.01225	.095	-.0076	.1076	
Kons 25	Kons 0	-.21000*	.01414	.000	-.2771	-.1429	
	Kons 5	-.24000*	.01291	.000	-.3004	-.1796	
	Kons 10	-.16000*	.01155	.000	-.2158	-.1042	
	Kons 15	-.10000	.02236	.142	-.2344	.0344	
	Kons 20	-.05000	.01225	.095	-.1076	.0076	
Games-Howell	Kons 0	Kons 5	-.03000	.01414	.386	-.0868	.0268
	Kons 10	.05000	.01291	.068	-.0043	.1043	
	Kons 15	.11000*	.02309	.039	.0074	.2126	
	Kons 20	.16000*	.01354	.000	.1047	.2153	
	Kons 25	.21000*	.01414	.000	.1532	.2668	
Kons 5	Kons 0	.03000	.01414	.386	-.0268	.0868	
	Kons 10	.08000*	.01155	.004	.0330	.1270	
	Kons 15	.14000*	.02236	.017	.0360	.2440	
	Kons 20	.19000*	.01225	.000	.1410	.2390	
	Kons 25	.24000*	.01291	.000	.1886	.2914	
Kons 10	Kons 0	-.05000	.01291	.068	-.1043	.0043	
	Kons 5	-.08000*	.01155	.004	-.1270	-.0330	
	Kons 15	.06000	.02160	.247	-.0468	.1668	
	Kons 20	.11000*	.01080	.000	.0667	.1533	
	Kons 25	.16000*	.01155	.000	.1130	.2070	
Kons 15	Kons 0	-.11000*	.02309	.039	-.2126	-.0074	
	Kons 5	-.14000*	.02236	.017	-.2440	-.0360	
	Kons 10	-.06000	.02160	.247	-.1668	.0468	
	Kons 20	.05000	.02198	.370	-.0552	.1552	
	Kons 25	.10000	.02236	.057	-.0040	.2040	
Kons 20	Kons 0	-.16000*	.01354	.000	-.2153	-.1047	
	Kons 5	-.19000*	.01225	.000	-.2390	-.1410	
	Kons 10	-.11000*	.01080	.000	-.1533	-.0667	
	Kons 15	-.05000	.02198	.370	-.1552	.0552	
	Kons 25	.05000*	.01225	.046	.0010	.0990	
Kons 25	Kons 0	-.21000*	.01414	.000	-.2668	-.1532	
	Kons 5	-.24000*	.01291	.000	-.2914	-.1886	
	Kons 10	-.16000*	.01155	.000	-.2070	-.1130	
	Kons 15	-.10000	.02236	.057	-.2040	.0040	
	Kons 20	-.05000	.01225	.046	-.0990	-.0010	

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Lampiran 11 Perhitungan SPSS Kadar Total Flavonoid pada Kalus Delima Hitam

Uji Normalitas

Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank
Hasil	Kons 0	2	6.75
	Kons 5	2	11.50
	Kons 10	2	2.75
	Kons 15	2	7.00
	Kons 20	2	3.50
	Kons 25	2	7.50
	Total	12	

Test Statistics^{a,b}

	Hasil
Chi-Square	7.623
Df	5
Asymp. Sig.	.178

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable:

Perlakuan

Uji Homogenitas

Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Hasil	Kons 0	2	2.50	5.00
	Kons 25	2	2.50	5.00
	Total	4		

Uji Man Whitney

Test Statistics ^a	
	Hasil
Mann-Whitney U	2.000
Wilcoxon W	5.000
Z	.000
Asymp. Sig. (2-tailed)	1.000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1.000 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan

b. Not corrected for ties.

Lampiran 12 Alat-Alat Kultur Jaringan Tumbuhan





Lampiran 13 Bahan Penelitian



Agar-Agar	MS	Gula	Biji Delima Hitam
------------------	-----------	-------------	--------------------------

Lampiran 14 Kegiatan Penelitian



Kotiledon	Kalus NAA 0,25 ppm + 1 ppm BAP	Media Perlakuan PEG
------------------	---------------------------------------	----------------------------



Bahan Sampel Kalus	Larutan Kurva Standart Kuersetin	Larutan Sampel
---------------------------	---	-----------------------



KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
JURUSAN BIOLOGI

Jl. Gajayana No. 50 Malang 65144 Telp./ Faks. (0341) 558933
Website: <http://biologi.uin-malang.ac.id> Email: biologi@uin-malang.ac.id

KARTU KONSULTASI SKRIPSI

Nama : Umi Sa'diyah
NIM : 15620001
Program Studi : Biologi
Semester : Ganjil T.A 2019
Pembimbing : Ruri Siti Resmisari, M.Si
Judul Skripsi : Peningkatan Kandungan flavonoid Kalus Delima Hitam (*Punica granatum L.*) dengan Penambahan *Polyeyhylene Glicol* (PEG) 6000 melalui Teknik *In Vitro*.

NO.	TANGGAL	URAIAN KONSULTASI	TTD PEMBIMBING
1.	10 November 2018	Konsultasi Judul Penelitian	1.
2.	12 Desember 2018	Konsultasi BAB I	2.
3.	23 Desember 2018	Konsultasi BAB I	3.
4.	9 Januari 2019	Konsultasi BAB I	4.
5.	18 Januari 2019	Konsultasi BAB I	5.
6.	24 Januari 2019	Konsultasi BAB I	6.
7.	1 Februari 2019	Konsultasi BAB I, II dan III	7.
8.	2 Februari 2019	Konsultasi BAB II dan III	8.
9.	4 Februari 2019	ACC Proposal	9.
10.	16 November 2019	Konsultasi BAB IV	10.
11.	19 November 2019	Konsultasi BAB IV	11.
12.	27 November 2019	Konsultasi BAB IV, V, dan Daftar Pustaka	12.
13.	2 Desember 2019	ACC Skripsi	13.

Malang, 2 Desember 2019

Pembimbing Skripsi,

Ruri Siti Resmisari, M.Si
NIP. 19790123201608012063

Ketua Jurusan,



Romaidi, M.Si., D.Sc
NIP. 19810201 200901 1 019



KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
JURUSAN BIOLOGI

Jl. Gajayana No. 50 Malang 65144 Telp./ Faks. (0341) 558933
Website: <http://biologi.uin-malang.ac.id> Email: biologi@uin-malang.ac.id

KARTU KONSULTASI AGAMA SKRIPSI

Nama : Umi Sa'diyah
NIM : 15620001
Program Studi : Biologi
Semester : Ganjil T.A 2019
Pembimbing : Ruri Siti Resmisari, M.Si
Judul Skripsi : Peningkatan Kandungan flavonoid Kalus Delima Hitam (*Punica granatum* L.) dengan Penambahan *Polyeyhylene Glicol* (PEG) 6000 melalui Teknik *In Vitro*.

NO.	TANGGAL	URAIAN KONSULTASI	TTD PEMBIMBING
1.	4 Februari 2019	Konsultasi Integrasi Ayat BAB I dan II	1.
2.	12 Februari 2019	ACC Integrasi BAB I dan II	2.
3.	27 November 2019	Konsultasi Integrasi Ayat BAB IV	3.
4.	28 November 2019	Konsultasi Integrasi Ayat BAB IV	4.
5.	2 November 2019	ACC Integrasi BAB IV	5.

Malang, 2 Desember 2019

Pembimbing Skripsi,

M. Mukhlis Fahrudin, M.S.I

NIPT. 20142011409

Ketua Jurusan,



Romaidi, M.Si., D.Sc

NIP. 19810201 200901 1 019