

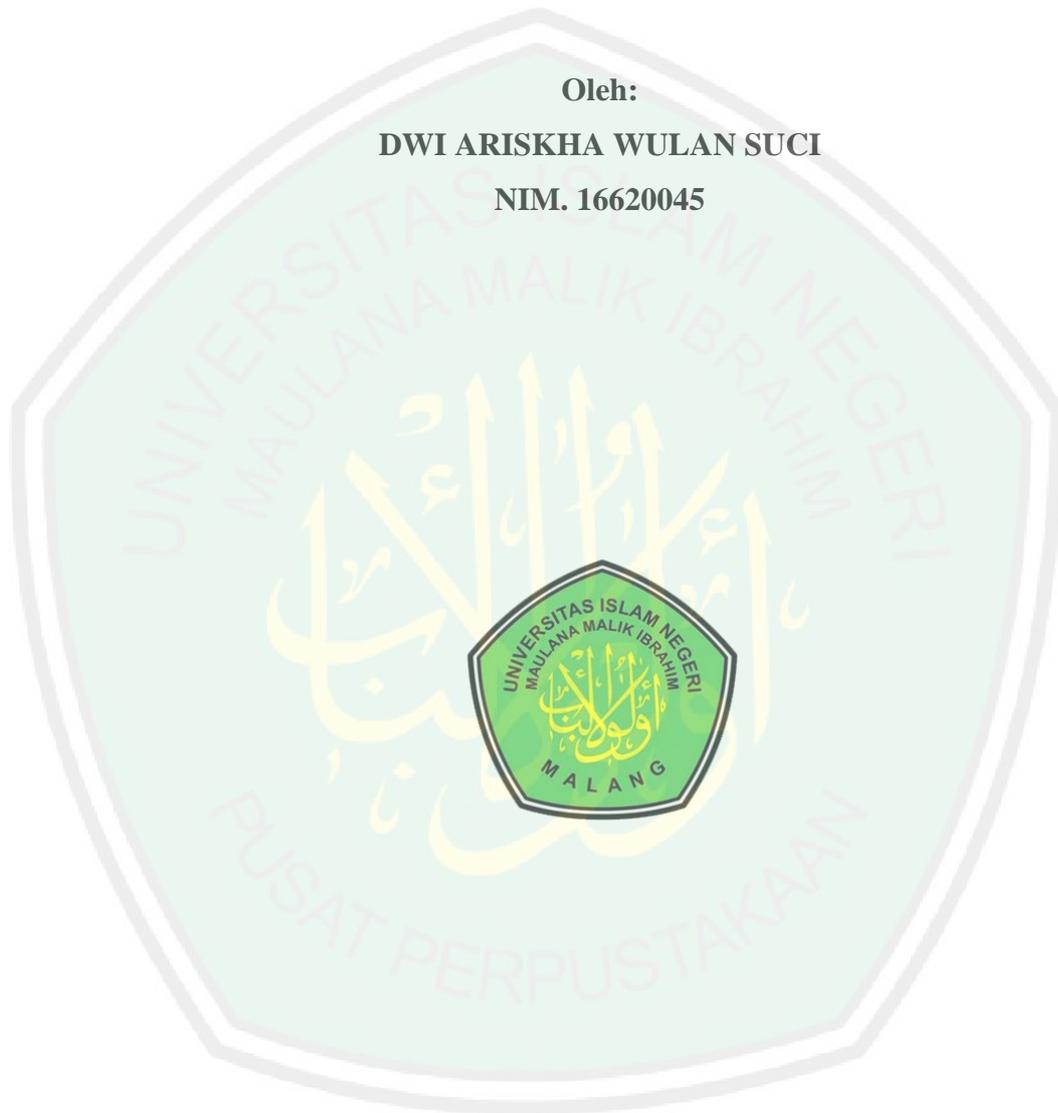
**PENGARUH KITOSAN TERHADAP KANDUNGAN FLAVONOID PADA
KALUS KESAMBI (*Schleichera oleosa* (Lour.) Merr) SECARA *IN VITRO***

SKRIPSI

Oleh:

DWI ARISKHA WULAN SUCI

NIM. 16620045



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI (UIN) MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2020**

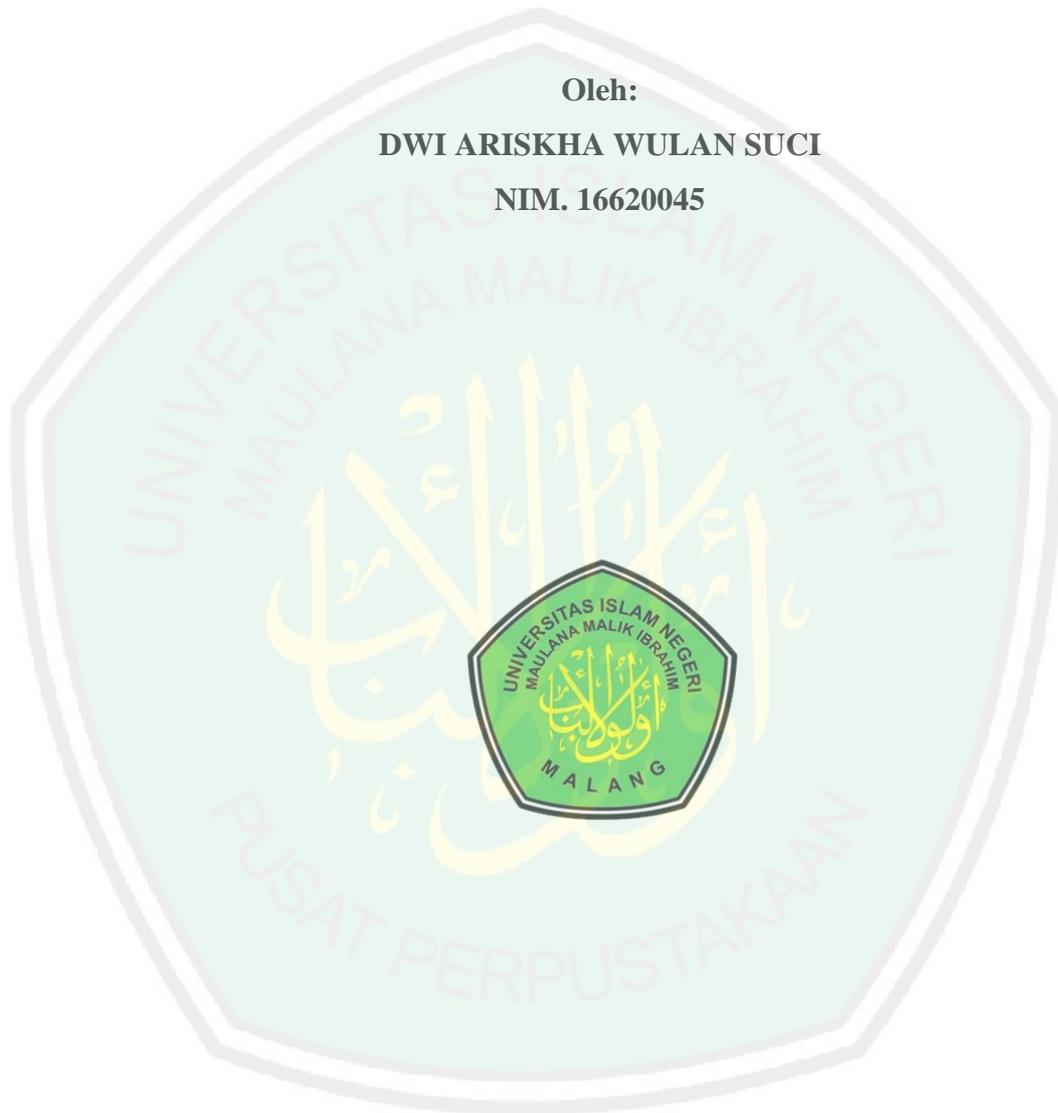
**PENGARUH KITOSAN TERHADAP KANDUNGAN FLAVONOID PADA
KALUS KESAMBI (*Schleichera oleosa* (Lour.) Merr) SECARA *IN VITRO***

SKRIPSI

Oleh:

DWI ARISKHA WULAN SUCI

NIM. 16620045



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI (UIN) MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2020**

**PENGARUH KITOSAN TERHADAP KANDUNGAN FLAVONOID PADA
KALUS KESAMBI (*Schleichera oleosa* (Lour.) Merr) SECARA *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:

DWI ARISKHA WULAN SUCI

NIM. 16620045

SKRIPSI



JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI (UIN) MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2020

**PENGARUH KITOSAN TERHADAP KANDUNGAN FLAVONOID PADA
KALUS KESAMBI (*Schleichera oleosa* (Lour.) Merr) SECARA *IN VITRO***

SKRIPSI

Oleh:

DWI ARISKHA WULAN SUCI

NIM. 16620045

Telah Diperiksa dan Disetujui oleh:
Tanggal: 16 November 2020

Dosen Pembimbing I



Ruri Siti Resmisari, M. Si
NIP. 19790123 2016081 2 063

Dosen Pembimbing II



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



Mengetahui,
Ketua Jurusan Biologi

Dr. Evika Sandi Savitri, M. P
NIP. 19741018 200312 2 002

**PENGARUH KITOSAN TERHADAP KANDUNGAN FLAVONOID PADA
KALUS KESAMBI (*Schleichera oleosa* (Lour.) Merr) SECARA *IN VITRO***

SKRIPSI

Oleh:

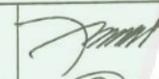
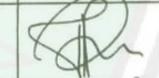
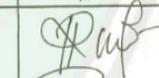
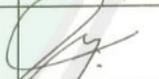
DWI ARISKHA WULAN SUCI

NIM. 16620045

Telah dipertahankan

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

Tanggal: 16 November 2020

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 2016081 2 063	
Anggota Penguji	: Dr. M. Mukhlis Fahrudin, M. S.I NIPT. 20142011409	



Mengesahkan,
Ketua Jurusan Biologi

Dr. Evika Sandi Savitri, M. P
NIP. 19741018 200312 2 002

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Dwi Ariskha Wulan Suci
NIM : 16620045
Jurusan : Biologi
Fakultas : Sains dan Teknologi
Judul Penelitian : Pengaruh Kitosan Terhadap Kandungan Flavonoid pada Kalus Kesambi (*Schleichera oleosa* (Lour.) Merr) Secara *In Vitro*

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar 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, 16 November 2020
Yang membuat pernyataan,



Dwi Ariskha Wulan Suci
NIM. 16620045

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

Allah tidak membebani seseorang melainkan sesuai kesanggupannya.

(QS. Al-Baqarah: 286)

Dan Dia (menundukkan pula) apa yang Dia ciptakan untuk kamu di bumi ini dengan berlain-lainan macamnya. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat tanda (kekuasaan Allah) bagi kaum yang mengambil pelajaran.

(QS. An-Nahl : 13)



HALAMAN PERSEMBAHAN

Alhamdulillah, Segala puji bagi Allah SWT, tiada kata yang dapat diucapkan selain bersyukur kepada Allah SWT yang telah memberikan Rahmat, Ridho, dan HidayahNya, sehingga saya dapat menyelesaikan tugas akhir saya dengan baik dan mendapatkan banyak wawasan serta pengetahuan yang sebelumnya tidak saya ketahui. Semoga doa, shalawat serta salam tercurah pada junjungan dan suri tauladan kita Nabi Muhammad SAW.

Persembahan tugas akhir ini dan rasa terima kasih saya ucapkan untuk:

1. Kedua orang tuaku, Bapak Sunardi dan Ibu Tarsini yang tiada hentinya untuk mendoakan, memberikan nasihat, dukungan moril serta materi serta keluarga dan adik Elsa Novita Pratiwi salah satu motivasiku agar tidak mudah menyerah dalam mencapai sebuah tujuan.
2. Terima kasihku pada guru-guru, dosen-dosenku, pembimbing skripsiku, serta penguji skripsi yang tidak kenal lelah untuk selalu memberikan ilmu dan nasehat yang bermanfaat sehingga saya bisa mencapai pendidikan saya sampai sejauh ini. Semoga ilmu yang bapak dan ibu berikan menjadi pahala di akhirat kelak.
3. Teruntuk support systemku Mas Harits Amrulloh, Nur Jazilatul Chikmah, dan Khoirotun Nisak yang tiada hentinya selalu bersamaku dalam suka maupun duka. Selalu ada ketika jatuh dan menguatkananku ketika bangkit, sehingga dapat terselesaikannya skripsi ini dengan lancar.
4. Teruntuk teman-teman KJT khususnya Khoirotun Nisak, Nur Jazilatul Chikmah, Immalia Muawannah, Nanda Rahma Maulidina, Salmawati, dan juga seluruh teman-teman seperjuanganku Biologi 16, terimakasih yang sebanyak-banyaknya telah memberikan motivasi, semangat, dan membantu selama penelitian berlangsung.
5. Tak lupa juga mbak Safira yang dari awal mendukungku dan sangat sering direpotkan. Terimakasih atas ilmu yang diberikan dan terimakasih selalu meluangkan waktunya. Semoga menjadi amal di akhirat kelak. Tidak lupa pula kuucapkan terimakasih kepada mbak Ilul, mbak Andini, dan mbak Umi yang telah membantu dan semangat selama penelitian ini berlangsung.
6. Serta semua pihak yang tak bisa kusebutkan satu persatu yang telah membantu terrealisasinya skripsi ini, semoga Allah selalu melimpahkan Rahmat dan Hidayah-Nya kepada kita semua. Amin Ya Robbal Alamiin..

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: Pengaruh Kitosan Terhadap Kandungan Flavonoid pada Kalus Kesambi (*Schleichera oleosa* (Lour.) Merr) secara *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. Ibu Dr. Sri Hartini, M. Si, selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Ibu Dr. Evika Sandi Savitri, M. P, selaku Ketua Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Ibu Ruri Siti Resmisari, 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
5. Bapak Dr. M. Mukhlis Fahrudin, M. S.I, selaku Dosen Pembeimbing 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. Ibu Dr. Evika Sandi Savitri, M. P dan Ibu Azizatur Rahmah, M. Sc, selaku dosen penguji yang telah memberikan ilmu yang sangat berguna bagi penulis.
7. Ibu Ir. Hj. Liliek Harianie, A. R., M. P 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. Ibundaku tercinta, Ayahandaku tersayang, dan kakak tercinta yang selalu memberikan yang terbaik dan berjuang tak kenal lelah untuk peneliti.
10. Semua teman-teman Biologi Angkatan 2016 yang telah berjuang bersama meraih cita.

Semoga Allah SWT memberikan balasan atas bantuan dan do'a yang diberikan kepada penulis. Penulis menyadari 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.*
Wassalamualaikum Wr. Wb.

Malang, 16 November 2020
Penulis,

Dwi Ariskha Wulan Suci



DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL
HALAMAN PERSETUJUAN	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
HALAMAN PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN.....	iii
HALAMAN PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI	iv
HALAMAN MOTTO	v
HALAMAN PERSEMBAHAN	vi
KATA PENGANTAR.....	vii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
ABSTRAK	xiv
ABSTRACT	xv
ملخص البحث	xvi
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan	4
1.4 Hipotesis.....	5
1.5 Manfaat Penelitian	5
1.6 Batasan Masalah.....	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1 Kesambi (<i>Schleichera oleosa</i> (Lour.) Merr)	6
2.1.1 Kesambi (<i>Schleichera oleosa</i> (Lour.) Merr) dalam Sudut Pandang Islam	6
2.1.2 Deskripsi Kesambi (<i>Schleichera oleosa</i> (Lour.) Merr).....	7
2.1.3 Khasiat Penggunaan dan Kandungan Senyawa Aktif.....	9
2.2 Kultur <i>In vitro</i>	9
2.2.1 Deskripsi Kultur <i>In vitro</i>	9
2.2.2 Faktor-Faktor Yang Mempengaruhi Kultur <i>In vitro</i>	10
2.2.3Manfaat Kultur <i>In vitro</i>	13
2.2.4 Zat Pengatur Tumbuh.....	12
2.3 Kultur Kalus	14

2.3.1	Tekstur Kalus	15
2.3.2	Warna Kalus	15
2.3.3	Teknik Kultur Kalus Untuk Memproduksi Metabolit Sekunder	16
2.4	Metabolit Primer	16
2.5	Metabolit Sekunder	17
2.6	Senyawa Flavonoid	18
2.7	Biosintesis Flavonoid	18
2.8	Mekanisme Kerja Elisitor	19
2.9	Peran Kitosan sebagai Elisitor Biotik	19
BAB III METODE PENELITIAN		23
3.1	Rancangan Penelitian	23
3.2	Waktu dan Tempat	23
3.3	Alat dan Bahan	23
3.3.1	Alat-alat	23
3.3.2	Bahan	26
3.4	Prosedur Penelitian	24
3.4.1	Sterilisasi Alat	24
3.4.2	Pembuatan Media	24
3.4.3	Tahap Subkultur	27
3.4.4	Tahap Pengamatan	25
3.5	Penetapan Kandungan Flavonoid	28
3.6	Analisis Data	30
3.7	Tahapan Penelitian	29
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN		30
4.1	Pengaruh Konsentrasi Kitosan Terhadap Kualitas dan Kuantitas Subkultur Kalus Kesambi (<i>Schleichera oleosa</i> (Lour.) Merr) secara <i>In Vitro</i>	30
4.2	Pengaruh Konsentrasi Kitosan Terhadap Kadar Flavonoid Kalus Kesambi (<i>Schleichera oleosa</i> (Lour.) Merr) secara <i>In Vitro</i>	39
4.3	Hasil Penelitian Perspektif Sains Dan Islam Subkultur Kalus Kesambi (<i>Schleichera oleosa</i> (Lour.) Merr)	44
BAB V PENUTUP		48
5.1	Kesimpulan	48
5.2	Saran	48
DAFTAR PUSTAKA		49
LAMPIRAN		72

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Morfologi Kesambi	8
Gambar 2.2 Struktur Kimia 2,4-D	13
Gambar 2.3 Struktur Kimia <i>Benzyladenin</i> (BA)	14
Gambar 2.4 Tekstur Kalus	15
Gambar 2.5 Warna Kalus	16
Gambar 2.6 Struktur Umum Flavonoid	18
Gambar 2.7 Struktur molekul kitin (β - (1-4) -N-asetil-D-glukosamin) dan kitosan (β - (1-4) -D-glukosamin).....	20
Gambar 2.8 Proses Biosintesis kitosan menghasilkan enzim fenilalanin	21
Gambar 3.1 Kurva Pertumbuhan Kalus	26
Gambar 3.2 Alur Tahap Penelitian	29
Gambar 4.1 Anatomi kalus kesambi dengan perlakuan kitosan dengan konsentrasi 2,5 mg/l pada perbesaran 400x	34
Gambar 4.2 Hasil Grafik Kurva Larutan Standar Kuersetin.....	40

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Komposisi media <i>Murashige dan Skoog</i> (MS).....	11
Tabel 3.1 Rancangan Penelitian.....	23
Tabel 4.1 Hasil Pengamatan Pengaruh Konsentrasi Kitosan Terhadap Kualitas (Warna dan Tekstur) Kalus Kesambi (<i>Schleichera oleosa</i> (Lour.) Merr) pada hari ke 90 HST	30
Tabel 4.2 Ringkasan Hasil Analisis Variasi (ANOVA) Pengaruh Pemberian Kitosan Terhadap Rata-Rata Berat Kalus)	36
Tabel 4.3 Hasil Uji DMRT Pengaruh Pemberian Konsentrasi Kitosan Terhadap Rata-Rata Berat Kalus	36
Tabel 4.4 Hasil dari Hubungan konsentrasi kuersetin dengan nilai absorbansi.....	40
Tabel 4.5 Kadar Total Flavonoid Kalus Kesambi dengan Pemberian Kitosan	41

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Alur Kerja Penelitian	61
Lampiran 2 Komposisi Bahan Kimia pada Media MS (mg/l)	62
Lampiran 3 Perhitungan dan Pengambilan Larutan Stok Hormon dan Kitosan ..	62
Lampiran 4 Perhitungan Konsentrasi Kitosan (mg/l)	63
Lampiran 5 Rata-Rata Berat Kalus	63
Lampiran 6 Warna Kalus Kesambi pada Media Perlakuan Konsentrasi Kitosan yang berbeda-beda	64
Lampiran 7 Tekstur Kalus Kesambi pada Media Perlakuan Konsentrasi Kitosan yang berbeda-beda	64
Lampiran 8 Hasil Identifikasi Kalus Kesambi dengan Menggunakan Mikroskop sebesar 400x	65
Lampiran 9 Perhitungan Manual Hasil Penelitian Kandungan Total Flavonoid pada Kalus Kesambi	67
Lampiran 10 Perhitungan SPSS Hasil Rata-Rata Berat Kalus Kesambi	70
Lampiran 11 Alat dan Bahan	71

ABSTRAK

Suci, Dwi Ariskha, W. 2020. Pengaruh Kitosan Terhadap Kandungan Flavonoid pada Kalus Kesambi (*Schleichera oleosa* (Lour.) Merr) secara *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: Dr. M. Mukhlis Fahrudin, M. S.I

Kata Kunci: Kesambi (*Schleichera oleosa* (Lour.) Merr), Kitosan, Kalus, Senyawa Flavonoid

Kesambi (*Schleichera oleosa* (Lour.) Merr) merupakan salah satu tanaman dikotil dari famili Sapindaceae yang dimanfaatkan dalam berbagai bidang, salah satunya digunakan sebagai obat. Adanya manfaat kesambi sebagai obat, menunjukkan tugas manusia sebagai khalifah di bumi untuk mempelajari dan mengungkap manfaat yang ada pada kesambi. Manfaat kesambi sebagai obat yaitu untuk obat antiinflamasi, obat analgesik, obat ulkus dan antioksidan. Adanya beberapa manfaat tersebut dikarenakan dalam kesambi terdapat kandungan metabolit sekunder yaitu flavonoid. Kandungan senyawa flavonoid dapat ditingkatkan melalui kultur kalus dengan penambahan zat pengatur tumbuh dan kitosan. Kitosan adalah elisitor biotik yang dapat menghasilkan enzim *Fenilalanin Amonia Lyase* (PAL) dan *Tirosin Amonia Lyase* (TAL). Kedua enzim ini bekerja dalam sintesis jalur fenilpropanoid dalam menghasilkan flavonoid.

Rancangan penelitian dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) 1 faktor dengan 6 perlakuan dan 4 ulangan. Perlakuan konsentrasi kitosan yaitu 0 mg/l , 0,5 mg/l , 1 mg/l , 1,5 mg/l , 2 mg/l , dan 2,5 mg/l selama 90 hari. Analisis data yang digunakan yaitu analisis secara deskriptif dan analisis variansi (ANOVA). Hasil dari penelitian ini adalah konsentrasi kitosan 2,5 mg/l menghasilkan kalus yang berwarna hijau, dengan tekstur kompak, anatomi kalus yang memiliki vakuola yang besar, sel tersusun rapat, dan terdapat butiran pati. Rata-rata berat kalus sebesar 0,47 gram. Uji analisis kandungan flavonoid pada pemberian kitosan 2,5 mg/l memberikan respon yang lebih optimal sebesar 230,05 µgQE/g.

ABSTRACT

Suci, Dwi Ariskha, W. S. 2020. The Influence of Chitosan against the Flavonoids in Callus of Kesambi (*Schleichera oleosa* (Lour.) Merr) through *in Vitro*. Thesis. Department of Biology, Faculty of Science and Technology, State Islamic University of Maulana Malik Ibrahim of Malang. Biology Advisor: Ruri Siti Resmisari, M. Si ., Religious Advisor: Dr. M. Mukhlis Fahrudin, M. S.I

Keywords: *Kesambi* (*Schleichera oleosa* (Lour.) Merr), Chitosan, Callus, Flavonoid Compounds

Kesambi (*Schleichera oleosa* (Lour.) Merr) is one of dicot plants from the Sapindaceae family which is used in various fields, one of which is used as medicine. The benefits of *kesambi* as medicine show the task of humans as caliphs on earth to study and uncover the benefits of the *kesambi*. The benefits of *kesambi* as medicine are anti-inflammatory drugs, analgesic drugs, ulcer drugs and antioxidants. There are some of these benefits because there are secondary metabolites, namely flavonoids. The content of flavonoid compounds can be increased through callus culture with the addition of growth regulators and chitosan. Chitosan is a biotic elicitor that can produce Phenylalanine Ammonia Lyase (PAL) and Tyrosine Ammonia Lyase (TAL) enzymes. Both of these enzymes work in the synthesis of the phenylpropanoid pathway in producing flavonoids.

The research design of the research used completely randomized design (CRD) with 1 factor with 6 treatments and 4 replications. Treatment of chitosan concentrations were 0 mg/l, 0.5 mg/l, 1 mg/l, 1.5 mg/l, 2 mg/l, and 2.5 mg/l for 90 days. The data analysis used descriptive analysis and analysis of variance (ANOVA). The results of the research showed that the chitosan concentration of 2.5 mg/l produced green callus, with a compact texture, the anatomy of the callus with a large vacuole, the tightly arranged cells, and contained starch grains. The average callus weight was 0.47 grams. The analysis test in flavonoid content in the chitosan administration of 2.5 mg/l gave a more optimal response of 230.05 $\mu\text{gQE/g}$.

ملخص البحث

سوجي، دوي أريسكا، و. 2020. تأثير الكيتوزان على محتوى الفلافونويد في كالوس كيسامي (*Schleichera oleosa* (Lour.) Merr) في المختبر. رسالة الجامعي. قسم علم الحياة، كلية العلوم والتكنولوجيا، جامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية مالانج. المشرف لعلم الحياة: روري ستي ريسمساري، الماجستير. المشرف لعلم الدين: الدكتور محمد مخلص فخر الدين، الماجستير

الكلمات المفتاحية: كيسامي (*Schleichera oleosa* (Lour.) Merr)، الكيتوزان، كالوس، مركبات الفلافونويد

إن كيسامي (*Schleichera oleosa* (Lour.) Merr) هو أحد نباتات الديكوتيل من عائلة *Sapindaceae* التي تستخدم في مجالات مختلفة، منها كالدواء. إن وجود فوائد كيسامي كالدواء يوضح وطيفة البشر كخليفة على الأرض في دراسة وكشف الفوائد الموجودة في كيسامي. وفوائد كيسامي كدواء هي الأدوية المضادة للالتهابات والأدوية المسكنة وأدوية القرحة ومضادة الأكسدة. وجود بعض هذه الفوائد لأنه يوجد في كيسامي مستقبلات ثانوية، وهي الفلافونويد. يمكن زيادة محتوى مركبات الفلافونويد من خلال زراعة الكالوس مع إضافة منظمات النمو والكيتوزان. الكيتوزان هو منتج حيوي يمكن أن ينتج إنزيمات (*Fenilalanin Amonia Lyase* (PAL) وأنزيمات (*Tirosin Amonia Lyase* (TAL). كلا هذين الإنزيمات يعملان في تركيب مسار فينيل بروبانويد *fenilpropanoid* لإنتاج الفلافونويد.

كان تصميم البحث في هذا البحث عبارة عن تصميم عشوائي بالكامل (CRD) مع عامل واحد بـ 6 معاملات و 4 مكررات. كانت معالجة تركيزات الكيتوزان هي 0 مجم / لتر و 0.5 مجم / لتر و 1 مجم / لتر و 1.5 مجم / لتر و 2 مجم / لتر و 2.5 مجم / لتر لمدة 90 يوما. وتحليل البيانات المستخدم عبارة عن تحليل وصفي وتحليل التباين (ANOVA). كانت نتائج هذا البحث أن تركيز الكيتوزان 2.5 ملجم / لتر ينتج الكالوس الذي كان أخضر اللون، مع النسيج المضغوط، وتشريح الكالوس الذي يحتوي على فجوة كبيرة، وكانت الخلايا معبأة بإحكام، وتحتوي على حبيبات النشا. يبلغ متوسط وزن الكالوس 0.47 جرام. أعطى اختبار التحليل محتوى الفلافونويد عند إعطاء 2.5 ملجم / لتر من الكيتوزان استجابة أفضل بمقدار 230.05 ميكروجرام / جم.

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Allah SWT menjadikan bumi sebagai tempat untuk hidup suatu organisme seperti tumbuhan. Tumbuhan merupakan makhluk hidup yang bagian tubuhnya memberikan manfaat bagi makhluk hidup lainnya. Hal ini sesuai dengan firman Allah dalam surat Asy-syuaraa 26:7 adalah :

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَيْفَ بَدَأْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ

Artinya : “Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapakah banyaknya Kami tumbuhkan di bumi itu pelbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik?” (Q.S. Asy-syuaraa 26: 7)

Menurut Shihab (2002) dalam tafsir Al-Misbah menjelaskan bahwa Allah SWT menyeru umat untuk merenungi segala sesuatu yang sudah diciptakanNya. Setelah itu mereka akan mendapat petunjuk. Tidak ada selain Allah yang dapat mengeluarkan dari bumi suatu tumbuhan yang baik yaitu dengan mendatangkan manfaat. Tumbuhan bernilai baik apabila dapat memberikan banyak manfaat seperti kesambi (*Schleichera oleosa* (Lour.) Merr).

Kesambi tergolong tanaman dikotil dari famili Sapindaceae yang tersebar di beberapa negara seperti India, Nepal, Indonesia, dan Malaysia (Guleria dan Vaidya, 2015). Beberapa penelitian menjabarkan berbagai manfaat kesambi di bidang industri dan di bidang kesehatan. Manfaat kesambi dalam bidang industri yaitu biji kesambi diolah sebagai bahan dasar mesin diesel yang tidak berbahaya atau biasa disebut dengan biodiesel (Verma, *et al*, 2016; Sekhar, *et al*, 2018) dan kayunya digunakan sebagai bahan dasar membuat perahu (Suita, 2012). Sedangkan kegunaan kesambi dalam bidang kesehatan yaitu sebagai antioksidan (Guleria dan Vaidya, 2015 ; Pokhrel, *et al*, 2015), obat analgesik dan antiinflamasi (Khan, *et al*, 2017; Jose, *et al*, 2019; Santha, *et al*, 2015).

Kandungan bahan aktif yang terdapat pada kesambi menghasilkan khasiat di dalamnya yang berasal dari kandungan metabolit primer dan metabolit sekunder. Metabolit primer pada kesambi seperti gula, asam amino, protein, dan klorofil. Sedangkan metabolit sekunder yang terdapat dalam kesambi adalah alkaloid,

terpenoid, fenol, flavonoid, dan tanin (Khandekar, *et al*, 2015). Kesambi banyak mengandung vitamin C sebagai antioksidan yang dihasilkan dari senyawa aktif flavonoid (Suita, 2012).

Flavonoid adalah salah satu metabolit sekunder yang termasuk golongan fenol yang dapat diperoleh dari bagian tanaman seperti akar, batang, daun, buah, dan biji (Mursyidi, 1990). Flavonoid dikembangkan karena bermanfaat sebagai antioksidan, antiinflamasi, antivirus, antitumor, antiaterosklerosis, antiosteoporosis, dan antitrombogenik. Flavonoid dikembangkan dalam produk makanan maupun suplemen karena sifatnya tidak mengandung racun dalam tubuh apabila dikonsumsi dengan takaran yang cukup (Simanjuntak, 2012).

Produksi metabolit sekunder termasuk flavonoid dapat dilakukan secara konvensional yaitu dengan ekstraksi bagian tubuh tumbuhan. Produksi metabolit sekunder secara konvensional memiliki kelemahan seperti lahan budidaya tanaman dalam skala besar, proses ekstraksi, isolasi, dan pemurnian tanaman sangat mahal, selain itu sumber daya alam akan mengalami kepunahan apabila diambil secara terus menerus. Alternatif dalam proses produksi metabolit sekunder agar tetap menjaga kelestarian suatu tumbuhan yaitu dengan teknik kultur *in vitro* (Pandiangan, *et al*, 2009).

Perkembangan melalui kultur *in vitro* dalam memproduksi metabolit sekunder sebagai salah satu alternatif karena tidak memerlukan bahan yang banyak, lahan yang luas, dan dapat memproduksi metabolit sekunder. (Balandrin dan Klocke, 1988). Keuntungan lain yang didapat yaitu tidak mengandalkan cuaca dan musim selain itu lingkungan tumbuh bebas hama dan penyakit (Collin dan Edward, 1998). Begitu juga dalam proses pemurnian metabolit sekunder melalui kultur *in vitro* yaitu lebih mudah karena eksplan yang digunakan sudah dikondisikan dalam keadaan steril (Docimo, *et al*, 2015 ; Dias, *et al*, 2016).

Menurut Katuuk (1989) peningkatan metabolit sekunder secara *in vitro* yang sering digunakan adalah kultur suspensi, kultur organ, dan kultur kalus. Salah satu upaya menghasilkan metabolit sekunder dalam jumlah banyak adalah menggunakan kultur kalus (Zulhildi, *et al*, 2012). Kalus merupakan sekumpulan sel yang belum terdiferensiasi dan sel-sel yang membentuk kalus ialah kumpulan

sel-sel parenkim. Kalus terbentuk dari hasil interaksi hormon auksin dan sitokinin ketika terjadi perlakuan pada eksplan (Pierik, 1987). Hal ini ditunjukkan pada hasil penelitian Arab, *et al* (2010) yaitu uji kandungan flavonoid pada daun *Stevia rebaudiana* menghasilkan 19,93 mg/g DW mengalami peningkatan pada kultur kalus menghasilkan 30,03 mg/g DW.

Zat pengatur tumbuh digunakan untuk menginduksi kalus dalam memproduksi metabolit sekunder pada tumbuhan. Pada penelitian ini kombinasi hormon yang digunakan adalah hormon *Benzyladenin* (BA) dengan hormon 2,4-D. 2,4-D adalah hormon sintesis jenis auksin yang mempunyai sifat stabil karena tidak mudah terurai oleh enzim-enzim yang dikeluarkan oleh sel pada saat proses pemanasan sterilisasi. Sedangkan Jenis sitokinin yang sering digunakan yaitu BA yang memiliki sifat stabil dan lebih efektif dibandingkan kinetin dalam proses pembelahan sel (Hendaryono dan Wijayani, 1994). Hasil penelitian yang dilakukan Puchoa (2018) menunjukkan bahwa perlakuan dengan menggunakan kombinasi BA 1,0 mg/l + 2,4-D 1,0 mg/l merupakan perlakuan pada leci (*Litchi chinensis* Sonn) dapat menginduksi kalus sebesar 73% dan membentuk kalus yang bertekstur kompak dan berwarna hijau.

Faktor lain yang perlu diperhatikan yaitu penambahan perlakuan dalam meningkatkan metabolit sekunder dengan menggunakan metode elisitasi. Menurut Vasconsuelo dan Boland (2007) elisitasi merupakan molekul signal yang memacu terbentuknya metabolit sekunder di dalam kultur. Senyawa yang berperan dalam proses elisitasi disebut elisitor. Elisitor adalah bahan yang berasal dari oligosakarida, glikoprotein, peptida, lipid atau fragmen dinding sel yang berasal dari bakteri dan fungi.

Elisitor dapat berupa biotik maupun abiotik. Setiap elisitor memiliki karakteristik masing-masing dan respon yang dihasilkan tergantung pada interaksi antara kalus dan elisitor begitu juga dengan konsentrasi elisitor yang ditambahkan (Vasconsuelo dan Boland, 2007). Elisitor biotik dapat diperoleh dari organisme dan mikroorganisme. Sedangkan elisitor abiotik diperoleh dari faktor fisika atau kimia. Elisitor yang digunakan dalam penelitian ini yaitu elisitor biotik. Jenis elisitor yang digunakan adalah kitosan.

Menurut Atmadja (2014) kitosan merupakan salah satu elisitor yang berasal dari eksoskeleton dari krustasea yang dapat dimakan. Menurut Katiyar, *et al* (2015) kitosan dimanfaatkan sebagai pertahanan diri suatu tumbuhan sehingga memicu reaksi fisiologis dan biokimia. Kitosan dalam memicu reaksi biokimia karena mengandung gula nukleotida (uridine difosfat N-asetil-d-glukosamin (UDP-GlcNAc) yang berperan dalam mengaktifkan sinyal untuk membentuk suatu enzim (Hadwiger, 2015 ; Malerba and Cerana, 2016). Enzim yang dihasilkan berupa *Fenilalanin Amonia Lyase* (PAL) dan *Tirosin Amonia Lyase* (TAL) yang berperan dalam peningkatan aktivitas senyawa fenolik. PAL dan TAL bekerja dalam sintesis jalur fenilpropanoid. PAL bertanggung jawab dalam memproduksi asam trans-sinamat dan TAL bertanggung jawab dalam memproduksi asam p-coumaric. Asam ini dibutuhkan dalam pembentukan senyawa fenolik seperti ester, kumarin, flavonoid, dan lignin. Selain itu, kitosan banyak dimanfaatkan dalam berbagai bidang karena dapat diserap oleh tubuh, tidak beracun, tidak memiliki efek samping, dan biodegradasi.

Penggunaan kitosan dalam meningkatkan metabolit sekunder telah dilakukan oleh beberapa peneliti yaitu pada hasil penelitian Rahman, *et al* (2003) bahwa pada kalus jeruk bali (*Citrus grandis*) pada perlakuan kitosan konsentrasi 1,0 mg/l mampu meningkatkan kandungan limonen dan linalool. Baque, *et al* (2012) bahwa pemberian konsentrasi kitosan 0,2 mg/l pada kultur akar adventif mengkudu (*Morinda citrifolia*) dapat meningkatkan kandungan antrakuinon dan flavonoid. Sangeetha, *et al* (2016) mengemukakan bahwa pemberian kitosan sebanyak 1,5 mg/l pada kalus *Pseudarthria visida* dapat meningkatkan kandungan fenol. Purwianingsih, *et al* (2018) dalam jurnalnya bahwa pada kalus daun mengkudu (*Morinda citrifolia*) dengan pemberian kitosan sebanyak 2 mg/l meningkatkan kandungan metabolit sekunder antrakuinon.

Penentuan konsentrasi kitosan yang digunakan dalam penelitian ini didasarkan pada bervariasinya pemberian konsentrasi kitosan pada beberapa uraian penelitian diatas. Berdasarkan latar belakang tersebut, penelitian mengenai “Pengaruh Kitosan Terhadap Kandungan Flavonoid pada Kalus Kesambi secara *In*

Vitro” perlu dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh kitosan terhadap kandungan flavonoid pada kalus kesambi.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dari penelitian ini adalah

1. Adakah pengaruh konsentrasi kitosan terhadap kualitas dan kuantitas subkultur kalus kesambi (*Schleichera oleosa* (Lour.) Merr) secara *in vitro* ?
2. Adakah pengaruh konsentrasi kitosan terhadap kadar flavonoid kalus kesambi (*Schleichera oleosa* (Lour.) Merr) ?

1.3 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah

1. Untuk mengetahui pengaruh konsentrasi kitosan terhadap kualitas dan kuantitas subkultur kalus kesambi (*Schleichera oleosa* (Lour.) Merr) secara *in vitro*.
2. Untuk mengetahui pengaruh konsentrasi kitosan terhadap kadar flavonoid kalus kesambi (*Schleichera oleosa* (Lour.) Merr).

1.4 Hipotesis

Hipotesis dari penelitian ini adalah

1. Adanya pengaruh konsentrasi kitosan terhadap kualitas dan kuantitas kalus kesambi (*Schleichera oleosa* (Lour.) Merr) secara *in vitro*.
2. Adanya pengaruh konsentrasi kitosan terhadap kadar flavonoid kalus kesambi (*Schleichera oleosa* (Lour.) Merr).

1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah

1. Menginformasikan manfaat kitosan sebagai agen pemicu peningkatan metabolit sekunder flavonoid pada kalus kesambi (*Schleichera oleosa* (Lour.) Merr).
2. Memperluas ilmu pengetahuan dalam meningkatkan nilai guna kesambi (*Schleichera oleosa* (Lour.) Merr).

1.6 Batasan Masalah

Batasan masalah dari penelitian ini adalah

1. Kalus kesambi yang berumur 12 minggu hasil dari subkultur sebanyak 3 kali diperoleh dari laboratorium Kultur Jaringan Tumbuhan Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Media dasar adalah *Murashige and Skoog* (MS).
3. Konsentrasi hormon yang digunakan pada media yaitu 1 mg/l BA dan 1 mg/l 2,4-D (Puchoa, 2018).
4. Konsentrasi kitosan terdiri dari 0, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5 mg/l/
5. Senyawa aktif yang didapat adalah flavonoid.
6. Parameter kalus yaitu secara kualitas, kuantitas, dan kandungan flavonoid. Parameter kualitas terdiri dari warna, tekstur, dan anatomi kalus. Sedangkan parameter kuantitas terdiri dari berat kalus.
7. Analisis kandungan flavonoid menggunakan spektrofotometri UV-Vis.
8. Analisis data menggunakan analisis data deskriptif dan analisis data ANAVA.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kesambi (*Schleichera oleosa* (Lour.) Merr)

2.1.1 Kesambi (*Schleichera oleosa* (Lour.) Merr) dalam Sudut Pandang Islam

Allah SWT telah menjelaskan dalam Al-Qur'an bahwa di bumi telah ditumbuhkan berbagai macam tumbuhan yang memiliki manfaat bagi manusia seperti kesambi (*Schleichera oleosa* (Lour.) Merr), yaitu pada Quran Surat Thaha ayat 53 sebagai berikut.

الَّذِي جَعَلَ لَكُمُ الْأَرْضَ مَهْدًا وَسَلَكَ لَكُمْ فِيهَا سُبُلًا وَأَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَخْرَجْنَا بِهِ أَزْوَاجًا مِّن نَّبَاتٍ شَتَّىٰ

Artinya: “Yang telah menjadikan bagimu bumi sebagai hamparan dan Yang telah menjadikan bagimu di bumi itu jalan-jalan, dan menurunkan dari langit air hujan. Maka Kami tumbuhkan dengan air hujan itu berjenis-jenis dari tumbuh-tumbuhan yang bermacam-macam”.

Syanqithi (2007) menafsirkan makna “tumbuh-tumbuhan yang bermacam-macam” bahwa Allah SWT telah menciptakan segala macam tumbuhan dari segi manfaat, warna, rasa, bentuk, ukuran, dan bau. Manfaat tumbuhan yang diciptakan oleh Allah salah satunya dapat digunakan sebagai obat seperti kesambi (*Schleichera oleosa* (Lour.) Merr). Dalam ayat lain menyebutkan bahwa Allah dalam penciptaan berbagai jenis tumbuhan yang ditumbuhkan dimuka bumi ini memberikan banyak manfaat yang digunakan oleh manusia. Menurut An-Najjar (Tanpa tahun) bahwa manusia hendaknya bijaksana dalam berfikir untuk mempelajari manfaat yang terdapat dalam tanaman kesambi agar dapat mendatangkan kebaikan bagi umat manusia. Hal ini diperjelas dengan firman Allah SWT dalam QS. Asy-Syuara ayat 26:80 adalah:

وَإِذَا مَرَضْتُ فَبُهِتَ النَّاسُ أَتَىٰ الْهَيْدَىٰ فَهِيَ كَأَن تَطْرُقُ النَّبْهَةَ

Artinya: “Dan apabila aku sakit, Dialah Yang menyembuhkan aku” (QS. Asy-Syuara ayat 26:80).

Al-Qarni (2007) dalam tafsir muyassar menerangkan bahwa Allah SWT yang menurunkan suatu penyakit dan Allah SWT juga yang menyembuhkan. Hendaknya manusia bersyukur ketika diberi nikmat kesehatan.

Bentuk usaha dari manusia adalah mencari obat untuk menyembuhkan penyakit dengan memanfaatkan tumbuhan kesambi sebagai obat. Hal ini juga dijelaskan dalam Hadits Riwayat Muslim.

Nabi SAW, bersabda,

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

Artinya: “Setiap penyakit pasti memiliki obat. Jika sebuah obat sesuai dengan penyakitnya maka dia akan sembuh dengan izin Allah Subhanahu wa Ta’ala”.

Manusia yang telah diberi akal untuk berfikir oleh Allah hendaknya memiliki jiwa kepedulian dalam menjaga alam dan lingkungan sekitar. Selain itu, manusia juga berperan dalam keilmuan Islam sebagai tindakan pengembangan ilmu pengetahuan tanpa menghilangkan etika dan nilai-nilai keislaman. Manusia dalam ilmu pengetahuan bertindak untuk mengembangkan dan memperluas pengetahuan seperti melakukan budidaya secara *in vitro*. Sebagaimana firman Allah SWT dalam Quran surat Al-An’am ayat 95 sebagai berikut.

إِنَّ اللَّهَ فَالِقُ الْحَبِّ وَالنَّوَى ۖ يُخْرِجُ الْحَيَّ مِنَ الْمَيِّتِ وَيُخْرِجُ الْمَيِّتَ مِنَ الْحَيِّ ۚ ذَلِكُمْ اللَّهُ ۗ فَأَنَّى تُؤْفَكُونَ

Artinya:”*Sesungguhnya Allah menumbuhkan butir tumbuh-tumbuhan dan biji buah-buahan. Dia mengeluarkan yang hidup dari yang mati dan mengeluarkan yang mati dari yang hidup. (Yang memiliki sifat-sifat demikian ialah Allah, maka mengapa kamu masih berpaling?)*”

Berdasarkan ayat di atas dapat diambil maknanya bahwa Allah menciptakan tumbuhan dari biji dan berkembang menjadi tumbuhan yang sempurna untuk diambil pelajaran oleh manusia. Makna dari “*Dia mengeluarkan yang hidup dari yang mati*” merupakan inspirasi dari kultur *in vitro* tumbuhan. Prinsip yang digunakan pada kultur *in vitro* yaitu menumbuhkan tumbuhan dari bagian yang tidak utuh, kemudian dari bagian yang tidak utuh tersebut berkembang menjadi tumbuhan yang utuh dan lengkap.

2.1.2 Deskripsi Kesambi (*Schleichera oleosa* (Lour.) Merr)

Kesambi (*Schleichera oleosa* (Lour.) Merr) merupakan tumbuhan berkayu yang berasal dari famili Sapindaceae dengan tinggi pohon mencapai 40 meter dan dapat ditemukan pada ketinggian 600 sampai 1000 m dpl. Kesambi tumbuh dan

tersebar di Indonesia sehingga masing-masing daerah tersebut memiliki penyebutan nama kesambi yang berbeda pula seperti kesambi (Jawa), sambi (Bali dan Bima), kahembi atau kasembi (Bima), kasambi (Sunda), kehabe (Sawu), kalabai (Alor), kabahi (solor), usapi (Timor), bado (Makasar) dan ading (Bugis) (Heyne, 1987).

Kusum nama lain dari kesambi mempunyai akar berjenis tunggang berwarna coklat. Kulit batang yang dimiliki kesambi juga memiliki warna yang sama seperti akar yaitu coklat (Suita, 2012). Cabang-cabang pada kesambi berwarna hitam ketika muda dan berubah coklat kekuningan ketika dewasa dengan cabang berbentuk bulat di setiap sisi. Daun pada kesambi pipih dengan bentuk daun lanset, ujung daun lancip, pertulangan daun menyirip, lebar daun 2 sampai 4 cm, dan warna daun muda berwarna ungu dan menjadi hijau ketika tua. Tangkai daun kesambi berbentuk bulat pipih dan berlekuk di atas. Bunga pada kesambi berwarna kuning pucat atau hijau pucat dengan kelopak bunga yang berbentuk bulat telur dengan panjang 1,5 mm. Buah pada kesambi berbentuk bulat telur dengan ukuran 15 x 13 mm. Biji pada kesambi juga memiliki bentuk bulat telur dengan ukuran 12 x 10 mm (Jannat, *et al*, 2016).



Gambar 2.1 Morfologi Kesambi (*Schleichera oleosa* (Lour.) Merr)
(Dasilva, 2016)

Klasifikasi kesambi (*Schleichera oleosa* (Lour.) Merr) menurut Plants
USDA (2019): Kingdom: Plantae

Division: Magnoliophyta

Class: Magnoliopsida

Subclass: Rosidae

Order: Sapindales

Family: Sapindaceae

Genus: *Schleichera* Willd

Spesies: *Schleichera oleosa* (Lour.) Merr

2.1.3 Khasiat Penggunaan dan Kandungan Senyawa Aktif

Kesambi dikembangkan sebagai obat alternatif karena menyimpan senyawa aktif berupa alkaloid, terpenoid, steroid, asam lemak, glikosida, resin, fenol, flavonoid, dan tanin (Beg, *et al*, 2011). Kandungan flavonoid dan tanin pada kesambi lebih dikembangkan karena bermanfaat sebagai obat antiinflamasi dan obat ulkus yang disebabkan bakteri *Helicobacter Pylori* (Srinivas, *et al*, 2013). Selain itu, senyawa tanin pada kesambi juga dimanfaatkan sebagai pembersih radikal bebas nitric oxide (NO) dan obat analgesik (Goswami dan Singh, 2017).

Ilmu pengetahuan semakin berkembang seiring banyaknya ditemukan berbagai jenis penyakit yang menyerang manusia seperti kanker. Pertumbuhan sel kanker pada tubuh sulit untuk terdeteksi karena pertumbuhannya tidak terkontrol dan abnormal. Penelitian terus dikembangkan dengan memanfaatkan kesambi sebagai obat herbal yang tidak mengandung efek samping dalam tubuh apabila dikonsumsi dengan kadar yang cukup. Menurut Shukla dan Mehta (2015) terdapat kandungan senyawa aktif pada kesambi seperti sianidin glikosida, asam klorogenik, triterpenoid, alkaloid, flavonoid, anthosianin, dan tanin yang telah dimanfaatkan sebagai obat kanker lambung, kanker payudara, kanker usus, limfoma, melenoma, dan karsinoma kelenjar susu.

Kesambi dimanfaatkan dalam berbagai bidang. Selain dimanfaatkan dalam bidang farmakologi, kesambi juga dimanfaatkan dibidang peternakan yaitu digunakan sebagai pakan ruminansia seperti sapi. Pemanfaatan kesambi sebagai pakan ternak karena mengandung senyawa aktif tanin. Tanin yang terkandung

dalam kesambi dapat meningkatkan pasokan protein dalam usus ruminansia. Selain itu, tanin juga bermanfaat sebagai sumber nutrisi pada usus hewan ruminansia (Devendra, *et al*, 2000).

2.2 Kultur *In vitro*

2.2.1 Deskripsi Kultur *In vitro*

Kultur *In vitro* merupakan teknik budidaya suatu tanaman dengan memotong bagian tanaman seperti bagian organ, sel, jaringan, dan protoplas ke dalam media steril dalam wadah tertutup yang dapat ditembus cahaya. Upaya ini dilakukan agar memudahkan suatu tanaman berfotosintesis. Media steril yang digunakan telah berisi unsur hara makro, mikro, zat pengatur tumbuh serta nutrisi tergantung dari tumbuhan yang akan dikembangkan. Hal ini dilakukan untuk memacu perbesaran, pembelahan sel dan membentuk suatu massa sel menjadi tanaman dewasa (Zulkarnain, 2011).

Teknik kultur *in vitro* terus dipelajari dan dikembangkan dalam ilmu pengetahuan. Proses tumbuhnya suatu tanaman melalui kultur *in vitro* sama dengan menanam langsung di tanah yaitu mengalami proses pertumbuhan sehingga berkembang menjadi planlet kemudian berkembang menjadi tanaman dewasa. Berkembangnya suatu tanaman melalui kultur *in vitro* melalui beberapa tahapan yaitu diawali dengan memilih sumber eksplan yang akan dikembangkan, tahap selanjutnya yaitu menentukan media yang sesuai dengan kebutuhan tanaman, kemudian proses pembentukan organ vegetatif sampai menjadi planlet, dan tahap terakhir aklimatisasi yaitu penyesuaian tanaman untuk ditumbuhkan keluar botol (Yuwono, 2006).

2.2.2 Faktor-Faktor Kultur *In vitro*

Faktor-faktor penting tersebut meliputi:

a. Media Tanam (Kultur)

Media merupakan tempat tumbuhnya eksplan sebagai penyedia nutrisi dan kebutuhan eksplan dalam proses pertumbuhan dan perkembangannya. Penambahan media ke dalam botol kaca tergantung dengan kebutuhan tanaman yang akan dikembangkan. Komposisi media terdiri dari gula, agar, vitamin, hormon, dan garam mineral. Hormon yang ditambahkan ke dalam media tergantung dari tujuan

kultur yaitu digunakan sebagai perbanyakan atau produksi metabolit sekunder. Media yang telah diolah ditempatkan pada botol-botol kaca yang telah ditutup rapat untuk dilakukan sterilisasi media dengan memanaskannya ke dalam autoklaf (Yuliarti, 2010).

Media yang banyak dikembangkan dan dimanfaatkan dalam kultur *in vitro* yaitu media dasar *Murashige and Skoog* (MS). Media MS banyak digunakan karena komposisi yang terkandung didalamnya sudah sesuai dengan kebutuhan tanaman. Media MS terdiri dari beberapa vitamin seperti asam folat, riboflavin, betin, kolin klorida, myo-inositol, dan piridoxin (Triharyanto, 2005). Komposisi yang terkandung dalam media MS adalah sebagai berikut (Purwantono dan Mardin, 2007).

Tabel 2.1 Komposisi media *Murashige dan Skoog* (MS)

No.	Unsur	Mg/liter
Unsur Makro		
1.	KNO ₃	1.900
2.	NH ₄ NO ₃	1.650
3.	MgSO ₄ . 7H ₂ O	370
4.	CaCl ₂ .2H ₂ O	332,2
5.	KH ₂ PO ₄	170
Unsur Mikro		
1.	Na ₂ EDTA	37,3
2.	FeSO ₄ . 7H ₂ O	27,8
3.	MnSO ₄ .H ₂ O	16,9
4.	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
5.	H ₃ BO ₃	6,2
6.	KI	0,83
7.	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
8.	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
9.	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025

b. Bahan Tanaman (eksplan)

Eksplan adalah tanaman induk yang diambil bagian kecil dari organ atau jaringan yang dipisahkan. Bagian tanaman yang dapat digunakan sebagai eksplan terdiri dari akar, batang, daun, tunas, biji, hipokotil, dan meristem. Faktor-faktor yang berpengaruh dalam pemilihan eksplan yaitu eksplan harus dalam keadaan sehat atau tidak terkena penyakit, ukuran eksplan, letak eksplan, dan umur eksplan (Wattimena *et al*, 1992).

c. Faktor Lingkungan

Lingkungan tumbuh adalah bagian yang harus diperhatikan dalam kultur *in vitro*. Faktor dalam lingkungan tersebut meliputi intensitas cahaya, posisi botol kultur diletakkan mendekati atau menjauhi sumber cahaya, dan panjang cahaya. Cahaya dibutuhkan dalam kultur sebagai upaya membantu dalam proses fotosintesis tumbuhan yang dikulturkan. Faktor lingkungan lainnya yaitu ukuran botol kultur, karena tergantung dari eksplan yang akan dikembangkan untuk perbanyakan atau produksi metabolit sekunder. Faktor lingkungan yang harus diperhatikan selanjutnya yaitu temperatur suhu ruang. Temperatur suhu yang digunakan yaitu berkisar 20°C sampai 30°C (Wirawan, 2003).

2.2.3 Manfaat Kultur *In vitro*

Manfaat yang diperoleh dari kultur *in vitro* sebagai berikut (Santoso dan Nursandi, 2003) yaitu dapat memproduksi tanaman dalam jumlah yang banyak dalam waktu singkat, budidaya yang dikembangkan dari bagian kecil dari tanaman tumbuh menjadi planlet, perbanyakan yang dilakukan menggunakan lingkungan yang terkontrol dan steril sehingga menghasilkan tanaman yang bebas dari hama dan penyakit. Manfaat lain yang didapat yaitu menjaga kelestarian tanaman yang hampir punah, tidak tergantung musim, tidak tergantung dari perubahan iklim, dan budidaya yang dilakukan tidak membutuhkan lahan yang luas.

2.2.4 Zat Pengatur Tumbuh

Zat pengatur tumbuh (ZPT) adalah senyawa-senyawa yang diinduksikan ke media yang karakteristiknya sama dengan hormon endogen yang diproduksi langsung oleh eksplan itu sendiri. ZPT dalam media bekerja sebagai pengatur

metabolik dalam pertumbuhan eksplan. Penambahan ZPT pada media dilakukan sebagai upaya mempercepat pertumbuhan suatu eksplan karena hormon endogen belum cukup dalam membantu pertumbuhan suatu eksplan. Namun, hal tersebut tergantung dari eksplan yang akan digunakan karena setiap eksplan akan menghasilkan hormon endogen yang berbeda (Zulkarnain, 2009).

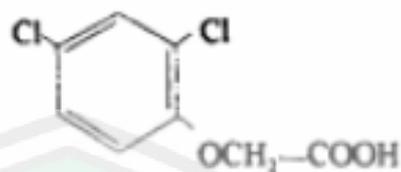
Menurut Wattimena (1992) zat pengatur tumbuh adalah jenis senyawa organik namun bukan termasuk hara yang ditambahkan dalam kadar sedikit dapat mendukung, merubah, maupun menghambat proses fisiologi tanaman. Kemampuan suatu tanaman berbeda dalam mengatur metabolisme tubuhnya tergantung dari genetik masing-masing tanaman. Zat pengatur tumbuh terdiri atas berbagai jenis dengan karakteristik masing-masing. Zat pengatur tumbuh tersebut terbagi atas 2 macam yaitu sebagai promotor dan inhibitor. Zat pengatur tumbuh promotor seperti giberelin, sitokinin, dan auksin. Sebaliknya zat pengatur tumbuh inhibitor seperti etilen dan asam absisat. Pembentukan organ-organ dan kalus dipengaruhi oleh penggunaan ZPT yang tepat. Pertumbuhan suatu tanaman dapat dilakukan tidak hanya menggunakan satu jenis ZPT, namun ZPT yang digunakan dapat lebih dari satu (Sriyanti, 1994).

2.2.4.1 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D)

Zat pengatur tumbuh yang ditambahkan dalam menginduksi kalus yaitu auksin. Auksin memiliki bermacam-macam jenis, namun yang umum digunakan adalah 2,4-D dan IAA. 2,4-D dibandingkan dengan IAA memiliki kerja yang lebih stabil karena pada proses sterilisasi dalam autoklaf enzim-enzim yang dikeluarkan tidak mudah terlepas (Indah dan Dini, 2013). 2,4-D banyak dikembangkan dalam produksi kalus karena efektif merangsang pembelahan sel dan pembentukan sel-sel. 2,4-D dikembangkan dalam berbagai macam jenis eksplan, pada tumbuhan jenis dikotil penambahan 2,4-D dengan konsentrasi <5 mg/l dapat merangsang pertumbuhan kalus (Mahadi, *et al*, 2016).

Penambahan konsentrasi 2,4-D yang terlalu tinggi dapat menyebabkan eksplan mengalami pencoklatan akibat dari respon terisnya flavons dan quinons yang berikatan dengan oksigen dalam vakuola. Konsentrasi yang terlalu tinggi

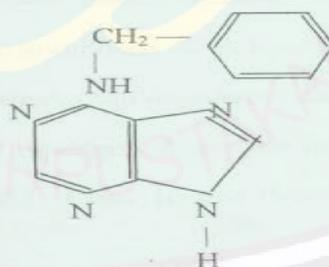
dapat menghambat pertumbuhan suatu eksplan dan dapat berubah menjadi herbisida (Hendaryono dan Wijayani, 1994).



Gambar 2.2 Struktur kimia 2,4-D (Gaspar, 1996)

2.2.4.2 Benzyladenin (BA)

ZPT seperti sitokinin memiliki bermacam-macam jenis dengan karakteristiknya masing-masing. Zat pengatur tumbuh jenis *Benzyladenin* (BA) lebih sering dimanfaatkan dibandingkan sitokinin jenis kinetin karena mempunyai aktivitas yang lebih kuat dan memiliki respon pertumbuhan dan pembelahan sel yang lebih baik. Selain hormon kinetin, 2-iP jarang dikembangkan dibandingkan BA karena hormon 2-iP karena memiliki daya aktivitas lebih lemah. Namun, tingkat keberhasilan tergantung dari konsentrasi yang ditambahkan (Zaer dan Mapes, 1982).



Gambar 2.3 Struktur kimia *Benzyladenin* (BA) (Abidin, 1982)

2.2.4.3 Kombinasi 2,4-D dan BA

Induksi ZPT dalam media dapat menggunakan dua jenis ZPT yang berbeda. ZPT yang berbeda akan memicu adanya interaksi didalamnya apabila ditambahkan secara bersamaan dengan konsentrasi tertentu. Dalam proses pertumbuhan kalus, ZPT yang saling berinteraksi yaitu jenis sitokinin golongan BA dan jenis auksin

golongan 2,4-D. Kombinasi yang tepat antara keduanya akan mendorong pembentukan sel dan massa sel. Penambahan konsentrasi keduanya tergantung dari kalus yang akan digunakan yaitu sebagai kalus non-embriogenik atau kalus embriogenik (Sitinjak, *et al*, 2006).

2.3 Kultur Kalus

Kultur kalus adalah teknik pemindahan eksplan ke dalam media aseptik dengan tujuan menghasilkan kalus yang bebas penyakit. Keuntungan yang didapat dalam mengembangkan kultur kalus meliputi tidak memerlukan area yang luas dalam penanaman, hasil dari kultur yang diproduksi lebih banyak, dan menghasilkan metabolit sekunder yang lebih tinggi (Yusnita, 2003). Kalus merupakan kumpulan dari sel-sel yang belum terorganisasi akibat dari sel yang terus membelah. Penyebab terbentuknya kalus pada kultur adalah terjadinya perlukaan pada permukaan eksplan yang terkena irisan kemudian akan melakukan proliferasi (Hendaryono dan Wijayani, 1994). Kalus terdiri atas beberapa tipe yaitu kalus embriogenik dan kalus non-embriogenik (Sugiyono, 1993).

Subkultur adalah proses pemindahan eksplan atau kalus ke media yang baru sebagai upaya menjaga kebutuhan nutrisi agar tetap terpenuhi. Subkultur dilakukan dengan menggunakan *Laminar Air Flow* (LAF) dalam kondisi steril dengan mengeluarkan kalus dari media lama ke cawan petri. Kalus tersebut kemudian dipotong menjadi bagian kecil dan dimasukkan ke media baru yang sama dengan komposisi media sebelumnya (Hendaryono dan Wijayani, 1994).

2.3.1 Tekstur Kalus

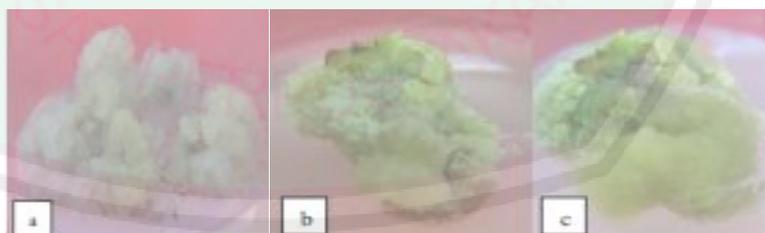
Kualitas dari kalus dapat dilihat secara langsung melalui tekstur. Tekstur terbagi atas 3 jenis yaitu kalus remah (*friable*), kalus intermediet, dan kalus kompak. Kalus yang bertekstur remah digunakan sebagai kalus untuk perbanyakan karena mudah untuk dipisahkan. Sedangkan kalus intermediet memiliki tekstur antara kalus remah dengan kompak (Andaryani, 2010). Ciri khas kalus kompak yaitu inti besar, banyak mengandung pati (karbohidrat), dan ukuran sel umumnya kecil (Ariati, 2012). Menurut Indah dan Ermavitalini (2013) kalus dengan tekstur kompak dikembangkan sebagai kalus penghasil metabolit sekunder karena teksturnya yang padat dan banyak menyimpan metabolit sekunder.



Gambar 2.4 Tekstur kalus (a) tekstur kalus remah, (b) tekstur kalus kompak, (c) tekstur kalus intermediet (1=remah, 2=kompak) (Yelnitis, 2012)

2.3.2 Warna Kalus

Perbanyakan tanaman maupun produksi metabolit sekunder melalui kalus dapat dibedakan melalui warna. Kalus untuk perbanyakan tanaman atau disebut kalus embriogenik memiliki kalus dengan warna putih susu dan mengkilat pada permukaannya. Sedangkan kalus yang didorong untuk produksi metabolit sekunder memiliki warna coklat. Kalus dengan warna coklat biasa disebut sebagai kalus non embriogenik karena memiliki kemampuan yang rendah dalam pembentukan organ (Sukmadjaja, 2011). Terdapat dua faktor yang mempengaruhi warna kalus, yaitu faktor dalam dan faktor luar. Faktor dalam yang mempengaruhi warna kalus berasal dari pigmentasi dan jenis eksplan yang digunakan. Sedangkan cahaya merupakan faktor luar yang mempengaruhi warna kalus menjadi kecoklatan karena intensitas cahaya yang berlebih menyebabkan kalus tercekam (Hendaryono and Wijayani, 1994).



Gambar 2.5 Warna kalus (a) putih, (b) putih kekuningan. (c) hijau (Yelnitis, 2012)

2.3.3 Teknik Kultur Kalus Untuk Memproduksi Metabolit Sekunder

Tahap pertumbuhan kalus dapat dilihat melalui kurva pertumbuhan melalui beberapa fase meliputi fase awal yaitu fase lag, pada fase ini belum terlihat nyata pertumbuhan pada kalus karena masih beradaptasi dengan media sehingga bobot

kalus masih sedikit, fase kedua yaitu fase eksponensial, pada fase ini kurva pertumbuhan meningkat dan pertumbuhan bobot kalus terlihat lebih nyata sampai memasuki fase ketiga yaitu fase linier, pada fase ini kurva terus meningkat keatas dan berhenti. Fase terakhir yaitu fase stasioner, pada fase ini kalus mengalami penurunan karena nutrisi yang terserap memenuhi sel-sel dan sel-sel mulai mengalami kematian (George dan Sherrington, 1994). Menurut Darwati (2007) pada fase stasioner terjadi peningkatan kandungan metabolit sekunder akibat dari respon kalus yang tercekam dan meningkatkan pembesaran pada vakuola sel yang terisi fenol.

Keberhasilan dalam memproduksi metabolit sekunder terdiri dari kondisi lingkungan, fisiologi tanaman, karakteristik genetik, unsur hara makro, unsur hara mikro, zat pengatur tumbuh dan pH media (Ernawati, 1992). Menurut Bhojwani dan Razdan (1996) penambahan elisitor pada media kultur dapat mendorong pembentukan senyawa aktif pada kalus.

2.4 Metabolit Primer

Biosintesis adalah proses penyusunan molekul sederhana menjadi molekul yang lebih kompleks dikarenakan katalisis enzim pada organisme yang akan membentuk suatu metabolit. Metabolit dibagi menjadi dua yaitu metabolit primer dan metabolit sekunder (Sholihah, 2011). Metabolit primer adalah senyawa esensial yang dihasilkan makhluk hidup seperti tumbuhan yang membantu dalam proses perombakan zat-zat dan proses sintesis dalam kelangsungan hidupnya (Darmono, 1995).

Metabolit primer mempunyai sifat *growth link* karena dibutuhkan dalam proses pertumbuhan setiap tumbuhan (Sudiby, 2002). Metabolit primer diperlukan dalam kelangsungan hidup organisme, karena jika tidak ada metabolit primer dalam tumbuhan akan mengganggu proses pertumbuhan, perkembangan, dan reproduksinya. Berbeda dengan metabolit primer, metabolit sekunder adalah proses yang tidak esensial bagi kehidupan tanaman. Sehingga hilangnya metabolit sekunder tidak akan menyebabkan kematian organisme secara langsung, tetapi menyebabkan penurunan kelangsungan hidup tumbuhan (Sholihah, 2011).

Metabolit sekunder terbentuk dari metabolit primer seperti asam mevalonat, asetil koenzim A, asam amino, dan zat antara dari jalur shikimat (Herbert, 1995). Beberapa faktor yang mempengaruhi pembentukan metabolit sekunder meliputi: cahaya, pH, suhu, dan aktivitas air (Sutardi, 2008).

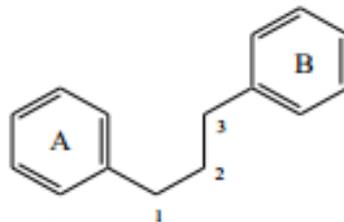
2.5 Metabolit Sekunder

Metabolit sekunder adalah senyawa yang tidak berperan langsung dalam pertumbuhan tanaman. Namun, berperan dalam hubungan antara tumbuhan dengan lingkungan seperti menjaga diri dari gangguan penyakit yang dapat menghambat kehidupannya (Ilyas, 2013). Senyawa metabolit sekunder bersifat tidak esensial dan dikeluarkan pada saat tertentu sehingga dalam proses produksinya sangat terbatas. Senyawa ini terbagi atas beberapa kelompok yaitu poliketida, alkaloid, terpenoid dan flavonoid (Raharjo, 2013).

Alkaloid adalah senyawa metabolit sekunder turunan asam amino yang tidak memiliki warna dan berbentuk kristal. Alkaloid dimanfaatkan sebagai obat antimalaria, membantu dalam sistem peredaran darah, kerja jantung, dan obat analgesik (Arifuddin, 2013). Terpenoid mengandung bau yang khas sehingga disebut sebagai minyak atsiri. Kandungan terpenoid pada tumbuhan tergantung dari jenis tumbuhan itu sendiri. Terpenoid dimanfaatkan sebagai pengusir serangga karena aroma yang dikeluarkannya dan digunakan sebagai pencegah daun dan bunga agar tidak rusak (Mukhriani, 2014). Flavonoid terbentuk lebih banyak didalam tanaman sehingga lebih sering dimanfaatkan karena berperan sebagai antioksidan (Redha, 2010).

2.6 Senyawa Flavonoid

Flavonoid adalah metabolit sekunder yang berasal dari setiap organ vegetatif dan organ generatif tumbuhan. Senyawa ini memiliki susunan struktur C₆-C₃-C₆ dapat dilihat pada gambar 2.7. Cincin benzen dari struktur C₆ akan terhubung dengan struktur C₃ sebagai rantai alifatik. Flavonoid terikat pada gula sebagai aglikon dan glikosida (Harborne, 1987). Kelompok flavonoid dapat dibedakan melalui cincin heterosiklik-oksigen tambahan dan gugus hidroksil dengan pola yang berbeda (Robinson, 1995).



Gambar 2.6 Struktur Umum Flavonoid (Achmad, 1986)

Menurut Harborne (1987) flavonoid tergolong senyawa fenol dengan pelarut polar yakni butanol, etanol, methanol, serta air sehingga mudah untuk diekstraksi. Flavonoid banyak dikembangkan karena bermanfaat sebagai penarik radikal bebas sehingga dimanfaatkan sebagai antioksidan (Robinson, 1995). Manfaat lain flavonoid yaitu sebagai agen antialergi, antiinflamasi, menghambat kerja virus, dan anti karsinogenik (Harborne, 1994).

2.7 Biosintesis Flavonoid

Flavonoid dalam biosintesisnya terdapat dua cincin yaitu cincin A dan Cincin B. Cincin A berasal dari jalur poliketida yaitu kondensasi dari jalur asetat atau malonat, sedangkan cincin B dan tiga atom karbon berasal dari jalur fenilpropanoida yaitu jalur shikimat. Kombinasi antara dua jenis biosintesis tersebut menghasilkan kerangka dasar karbon dari flavonoid yaitu jalur shikimat dan jalur asetat-malonat. Ketiga atom karbon dari rantai propane mengalami perubahan karena kerja enzim dan menghasilkan berbagai gugus fungsi seperti ikatan rangkap, gugus hidroksil, gugus karbonil dan sebagainya (Hahlbrock, 1975).

Jalur biosintesis flavonoid dimulai dari produk yang dihasilkan dalam tahap glikolisis yaitu fosfoenol piruvat. Setelah melalui tahap glikolisis, produk akan memasuki jalur shikimat yang akan menghasilkan fenilalanin sebagai materi awal untuk alur metabolit fenil propanoid. Alur tersebut kemudian menghasilkan 4-coumaryl-coA dan bergabung dengan malonyl-coA untuk menghasilkan struktur sejati flavonoid. Flavonoid yang terbentuk pertama kali pada biosintesis ini disebut khalkon. Turunan dari khalkon melalui berbagai alur dan rangkaian proses enzimatik yaitu seperti flavanol, flavan 3-ols, proantosianidin (tannin) (Hahlbrock, 1981).

2.8 Mekanisme Kerja Elisitor

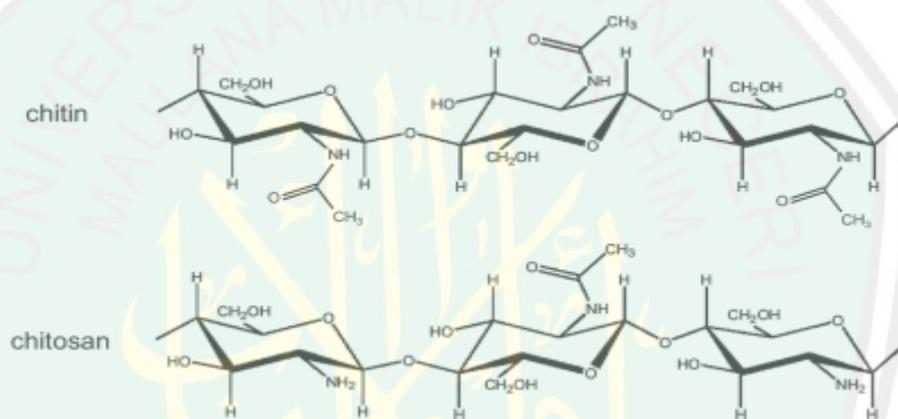
Elisitor bekerja dalam mengaktifkan gen dengan mengkode enzim yang diperlukan untuk sintesis fitoaleksin dalam tumbuhan. Elisitor juga bekerja dalam meningkatkan metabolit sekunder dan enzim lain pada tumbuhan (Eilert, *et al*, 1986). Elisitor terdiri dari dua kelompok yaitu elisitor biotik dan elisitor abiotik. Elisitor abiotik berasal dari logam berat, radiasi sinar ultraviolet, senyawa anorganik, dan detergen. Sedangkan elisitor biotik terbagi atas dua kelompok elisitor endogen dan elisitor eksogen yaitu (Salisbury, 1995): Elisitor endogen dihasilkan dari tumbuhan itu sendiri, ketika tumbuhan tersebut terserang oleh patogen akan menyebabkan dinding sel (poligogalakturonat) yang rusak dan elisitor eksogen berasal dari organisme maupun mikroorganisme seperti kitosan. Selain itu elisitor eksogen dapat berupa senyawa yang disintesis seperti protein (enzim), Cu^{2+} , Mn , Al^{3+} .

2.9 Peran Kitosan sebagai Elisitor Biotik

Kitosan adalah senyawa polisakarida turunan kitin dengan memanfaatkan limbah kerang, kepiting, dan udang. Kitosan memiliki rantai yang lebih pendek daripada rantai kitin, sehingga kitosan dapat diserap oleh tubuh. (Mahatmanti dan Sumrni, 2003). Kitosan dapat diturunkan dari kitin melalui proses deasetilasi dengan cara mereaksikannya dengan alkali konsentrasi tinggi dengan waktu yang relatif lama dan suhu tinggi. Karakteristik dari kitosan yaitu larut dalam larutan asam sehingga mengandung kation yang bermuatan positif. Proses deasetilasi pada kitin tidak pernah selesai sehingga dalam kitosan masih ada gugus asetil (Kusumawati, 2009).

Kitosan efektif dalam mengadsorpsi kation dari zat-zat organik (lemak dan protein) maupun kation ion logam berat karena pada sepanjang rantai polimernya terdapat gugus hidroksil dan amino (Lee, *et al*, 1999). Kitosan lebih banyak dimanfaatkan dibanding kitin karena kitosan mampu membentuk sebuah adsorben ketika adanya pengikatan zat-zat organik maupun anorganik (Sanjaya dan Yuanita, 2007). Kitosan memiliki bentuk dan morfologi sama seperti kitin yaitu strukturnya kristal dan berbentuk padatan amorf dengan warna putih. Kitin memiliki rantai panjang sedangkan rantai yang dimiliki kitosan lebih pendek (Pratiwi, 2014).

Perbedaan antara kitin dan kitosan yaitu kitin memiliki derajat deasetilasi (DD) sampai 10% dan mengandung nitrogen sebesar <7%. Sedangkan kitosan memiliki derajat deasetilasi >70% dan kandungan nitrogennya sebesar >7% (Taufan dan Zulfahmi, 2010). Mekanisme pembentukan kitosan dari kitin diawali dari reaksi hidrolisa suatu amida dan basa. Kitin dalam reaksinya berperan sebagai amida dan NaOH sebagai basanya sehingga menghasilkan reaksi adisi. Reaksi ini dimulai dari gugus -OH-min yang masuk ke dalam gugus NHCOCH_3 kemudian tereliminasi gugus CH_3COO^- sehingga terbentuk amida yaitu kitosan (Taufan dan Zulfahmi, 2010).

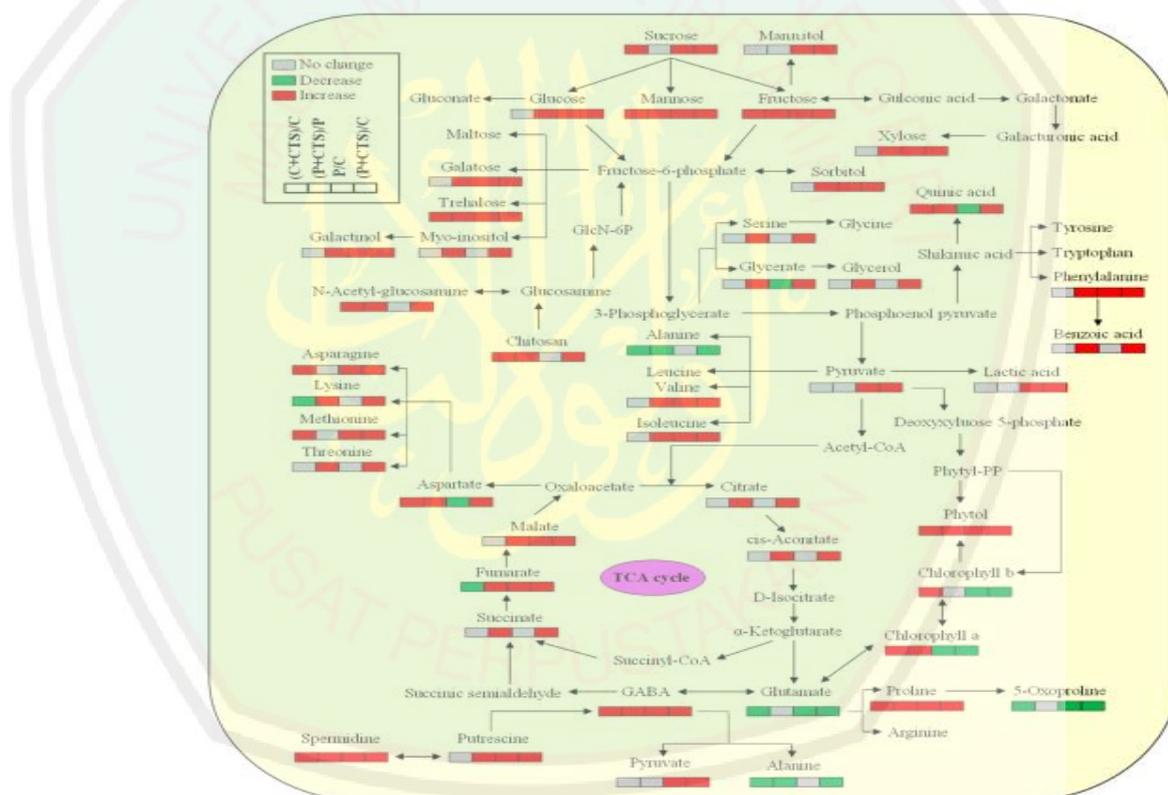


Gambar 2.7 Struktur molekul kitin (β - (1-4) -N-asetil-D-glukosamin) dan kitosan (β - (1-4) -D-glukosamin) yang dihasilkan dari deasetilasi parsial kitin (Badawy and Rabea, 2011)

Kitosan banyak dimanfaatkan dalam berbagai bidang seperti bidang pengolahan air, bidang makanan, dan bidang kesehatan. Kitosan dalam bidang pengolahan air digunakan sebagai bahan baku pembuatan membran ultrafiltrasi. Kitosan juga dimanfaatkan dalam bidang makanan yaitu sebagai obat diet karena dapat menyerap lemak sehingga banyak negara yang mengembangkan kitosan seperti Eropa, Amerika Serikat, dan Jepang sudah menambahkan kitosan sebagai komposisi yang ditambahkan dalam produk makanan. Selain itu, kitosan juga dimanfaatkan sebagai bahan pengawet makanan berbagai produk seperti nuget, sosis, olahan ikan, buah-buahan, mayonise, dan mie instan karena memiliki aktivitas antioksidan dan antimikroba. Memanfaatkan kitosan dalam bidang pangan juga untuk menghindari konsumen terjangkit penyakit tifus. Sedangkan kitosan

dalam bidang kesehatan dimanfaatkan sebagai obat menjaga sistem imun, antikanker, antibakteri, obat salep untuk luka, ortopedi dan penyembuhan jahitan akibat pembedahan (Kusumawati, 2009).

Kitosan selain dikembangkan dalam berbagai bidang juga digunakan sebagai elisitor. Kitosan dalam kerjanya dapat menginduksi metabolit sekunder sebagai elisitor eksogen dalam menghasilkan enzim *Phenylalanine ammonia lyase* (PAL), *peroxidase*, *polifenol oksidase*, *katalase*, dan aktivitas superoksida dismutase. PAL adalah enzim yang mengkatalisasi biotransformasi L-fenilalanin sebagai produk awal dalam jalur fenilpropanoid sebagai penyusunan golongan fenol seperti flavonoid (Srisornkompon, *et al*, 2014).



Gambar 2.8 Proses Biosintesis kitosan dalam menghasilkan enzim fenilalanin (Li, *et al*, 2017)

Menurut Moye, *et al* (2014) glukosamin menghasilkan beberapa enzim salah satunya adalah glukosamin-6 fosfat deaminase (GlcN6P deaminase). Enzim ini bekerja dalam jalur katabolisme kitin untuk masuk ke dalam metabolisme karbon utama. Aktivitas enzim dalam biosintesis berperan dalam transformasi

glukosamin menjadi fruktosa-6-fosfat kemudian memasuki tahap glikolisis untuk menghasilkan asam piruvat. Hal ini didukung oleh Guyton (1994) bahwa glukosa diubah menjadi glukosa-6 fosfat pada fase glikolisis. Kemudian dilakukan perombakan glukosa-6 fosfat menjadi fruktosa-6-fosfat. Perombakan kembali dilakukan dengan merombak fruktosa-6-fosfat menjadi fruktosa 1,6-fosfat dengan membentuk ATP kemudian menyusun 1,3-fosfogliserat, 3-asam fosfogliserat, 2-asam fosfogliserat, kemudian diubah menjadi fosfoenolpiruvat kemudian menjadi asam piruvat. Tahap selanjutnya yaitu memasuki jalur shikimat dengan menghasilkan fenilalanin yang berperan dalam penyusunan senyawa flavonoid (Vickery, 1981).



BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan secara ekperimental yang dirancang dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) tunggal menggunakan konsentrasi elisitor kitosan. Konsentrasi kitosan yang ditambahkan dalam media kalus kesambi meliputi 0 mg/l, 0,5 mg/l, 1 mg/l, 1,5 mg/l, 2 mg/l, dan 2,5 mg/l. Dari 6 perlakuan tersebut dilakukan 4 kali ulangan sehingga terbentuk 24 percobaan yang disajikan pada tabel 3.1.

Tabel 3.1 Rancangan Penelitian

Perlakuan	Konsentrasi (mg/l)
KT 1	0
KT 2	0,5
KT 3	1
KT 4	1,5
KT 5	2
KT 6	2,5

Keterangan: KT 1 : kitosan 0 mg/l, KT 2: kitosan 0,5 mg/l, KT 3: kitosan 1 mg/l, KT 4: kitosan 1,5 mg/l, KT 5: kitosan 2 mg/l, dan KT 6: kitosan 2,5 mg/l.

3.2 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan selama bulan Maret sampai Agustus 2020 yang bertempat di Laboratorium Kultur Jaringan Jurusan Biologi dan Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.3 Alat dan Bahan

3.3.1 Alat-alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini terbagi atas dua kelompok yaitu alat yang digunakan subkultur dan analisis kandungan flavonoid. Alat-alat yang mendukung kegiatan subkultur terdiri dari timbangan analitik, *hot plate* dan *stirer*, *beaker glass*, spatula, mikropipet, pH meter, botol kultur, lemari es, oven, gelas ukur, keranjang, autoklaf, *Laminar Air Flow* (LAF), bunsen, cawan petri, *handsprayer*, dan alat diseksi (*blade*, *scalpel handle*, pinset). Sedangkan alat-alat dalam analisis kandungan flavonoid terdiri dari oven, *micro tube*, mortar dan pestle, kuvet, dan spektrofotometri UV-Vis.

3.3.2 Bahan

Pelaksanaan kegiatan subkultur dan analisis kandungan flavonoid tidak terlepas dari bahan yang akan digunakan. Bahan yang diperlukan dalam proses subkultur meliputi kalus kesambi (*Schleichera oleosa* (Lour.) Merr) yang berumur 12 minggu, agar, gula, media MS, BA, 2,4-D, kitosan, aquades, asam asetat, aquades steril, alkohol 70%, alkohol 96%, tisu, korek api, kertas label, karet, plastik, spirtus dan *alumunium foil*. Bahan yang diperlukan dalam menganalisis kandungan flavonoids meliputi kuersetin, methanol 80%, aquadest, NaNO_3 5%, AlCl_3 10%, dan NaOH 1 M.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Sterilisasi Alat

Langkah kerja yang dilakukan adalah botol kultur, *beaker glass*, gelas ukur, erlenmeyer, cawan petri, pinset dan *scalple* dicuci dengan detergen cair dan dibilas bersih menggunakan air. Peralatan seperti botol kultur yang telah kering dan bersih kemudian disterilisasi selama 4 jam menggunakan oven dengan suhu 121°C . Alat kaca seperti cawan petri dibungkus dengan kertas, berbeda dengan pinset serta *scalpel* dibungkus dengan *alumunium foil*. Masing-masing alat dibungkus plastik selanjutnya disterilisasi menggunakan autoklaf.

3.4.2 Pembuatan Media

3.4.2.1 Pembuatan Larutan Stok

a. Larutan Stok Hormon

Tujuan dari pembuatan larutan stok adalah agar memudahkan dalam mencampurkan ke dalam media kultur. Langkah kerja yang dilakukan yaitu hormon BA dan 2,4-D ditimbang menggunakan timbangan analitik sebanyak 10 mg dan ditambahkan aquades sebanyak 100 ml ke dalam erlenmeyer. Masing-masing hormon di homogenkan diatas *hot plate* dan *stirer* hingga tercampur. Larutan yang telah homogen dipindahkan ke dalam botol masing-masing dengan diberi label tanggal dan nama hormon.

b. Larutan Stok Kitosan

Langkah kerja dalam pembuatan larutan stok kitosan 100 mg/l yaitu kitosan ditimbang dengan menggunakan timbangan analitik sebanyak 10 mg, kemudian

ditambahkan 10 tetes asam asetat dan ditambahkan aquades sampai 100 ml yang dimasukkan ke dalam erlenmeyer untuk dihomogenkan menggunakan *hot plate* dan *stirer* tanpa pemanasan. Larutan yang telah tercampur dipindahkan ke dalam botol dan diberi label.

3.4.2.2 Pembuatan Media Subkultur

Tahap yang dilakukan dalam pembuatan media subkultur 600 ml adalah gula dan media MS ditimbang masing-masing sebanyak 18 gram dan 2,658 gram pada timbangan analitik. Kemudian gula dan media MS dimasukkan ke dalam *beaker glass* dengan menambahkan aquades sebanyak 600 ml diatas *hot plate* tanpa pemanas. Setelah teraduk dengan rata larutan ditambahkan hormon 2,4-D konsentrasi 1 mg/l sebanyak 6 ml dan hormon BA konsentrasi 1 mg/l sebanyak 6 ml. Kemudian ditambahkan konsentrasi kitosan dengan konsentrasi yang berbeda yaitu 0 mg/l, 0,5 mg/l, 1 mg/l, 1,5 mg/l, 2 mg/l, dan 2,5 mg/l dengan 6 botol yang berbeda. Tahap selanjutnya yaitu media yang telah tercampur diatur pHnya, apabila pH dibawah 5,7 ditambah NaOH 1% dan apabila diatas 5,7 ditambah HCL. Agar sebanyak 0,8 gram ditimbang 6 kali dan dimasak satu persatu pada konsentrasi berbeda diatas *hotplate* dengan pemanas. Media yang telah masak dipindahkan pada 8 botol kultur dan ditutup menggunakan plastik tahan panas. Tabel pengenceran ditunjukkan pada tabel 3.2.

Tabel 3.2 Tabel Pengenceran

No.	Perlakuan	Larutan (ml)	Kitosan (ml)
1.	KT 1	100	0
2.	KT 2	99,5	0,5
3.	KT 3	99	1
4.	KT 4	98,5	1,5
5.	KT 5	98	2
6.	KT 6	97,5	2,5

3.4.3 Tahap Subkultur

Subkultur pada kalus kesambi dilakukan untuk mengganti media yang nutrisinya telah habis terserap oleh kalus. Upaya ini dilakukan agar kalus tetap

tumbuh dan hidup. Kalus dari media lama dipindah ke media baru sebanyak dua sampai tiga kali. Kemudian kalus dikeluarkan dari botol kultur dan diletakkan ke dalam cawan petri, kalus tersebut kemudian ditimbang dengan berat yang sama yaitu 0,1 gram sebagai bobot awal. Selanjutnya kalus ditanam pada media berisi kitosan sebagai elisitor untuk memicu metabolit sekunder selama 90 hari.

3.4.4 Tahap Pengamatan

Langkah kerja dalam pengamatan kalus adalah

1. Pengamatan kualitas dan kuantitas menggunakan waktu 90 hari terakhir karena memasuki fase stasioner. Pada fase ini menunjukkan akumulasi kandungan metabolit sekunder meningkat dapat dilihat pada gambar 3.1. Pengamatan kualitas meliputi warna, tekstur, dan anatomi kalus. Sedangkan pengamatan kuantitas meliputi berat kalus.
2. Uji kandungan flavonoid pada kalus dilakukan setelah 90 hari subkultur menggunakan spektrofotometri UV-Vis.

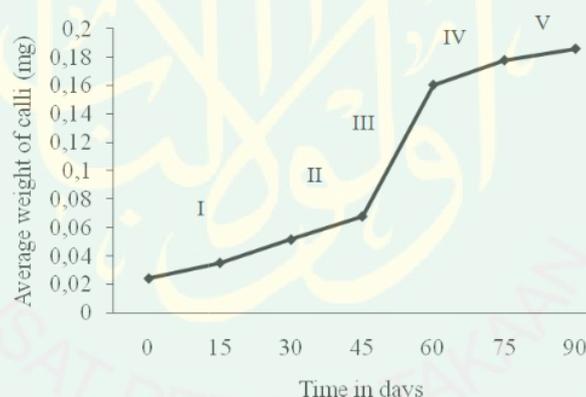


FIGURE 2. Growth curve of calli of ipê-branco formed from leaf segments. I - lag phase, II - exponential phase, III - linear growth phase, IV - deceleration phase and V - stationary phase.

Gambar 3.1 Kurva Pertumbuhan Kalus (Abbade, *et al*, 2010).

3.5 Penetapan Kandungan Flavonoid

3.5.2 Ekstraksi Kalus Kesambi (*Schleichera oleosa* (Lour.) Merr)

Tahap ekstraksi kalus pada penelitian ini yaitu kalus kesambi di timbang sebanyak 0,5 gram dan dimasukkan ke dalam mortar. Kalus yang telah ditimbang dihaluskan menggunakan alu. Tahap selanjutnya, kalus direndam menggunakan

pelarut methanol 80% sebanyak 5 ml ke dalam tabung reaksi. Kemudian tabung reaksi tersebut divorteks selama 5 menit dan dishaker selama 2 jam. Hasil ekstraksi kalus didiamkan selama 24 jam.

3.5.3 Pengukuran Kandungan Flavonoid

3.5.3.1 Pembuatan Larutan Standar Kuersetin

Larutan stok kuersetin sebanyak 1000 ppm dengan cara menimbang 25 mg kuersetin dan dilarutkan dengan methanol 80% hingga 25 ml. Kemudian, larutan standar kuersetin dibuat dengan konsentrasi berbeda yaitu 5 ppm, 25 ppm, 50 ppm, 100 ppm, 200 ppm, dan 300 ppm dengan cara dipipet larutan induk kuersetin sebanyak 0,05 ml, 0,25 ml, 0,5 ml, 1 ml, 2 ml, dan 3 ml. Tahap yang dilakukan yaitu larutan standar kuersetin dengan berbagai konsentrasi masing-masing diencerkan dengan aquadest sampai volume 10 ml.

3.5.3.2 Pengukuran Larutan Standar Kuersetin

Larutan standar kuersetin pada masing-masing konsentrasi dipipet sebanyak 1 ml. Larutan standar tersebut kemudian ditambahkan aquadest 4 ml, NaNO_3 5% sebanyak 0,3 ml kemudian larutan divortex dan didiamkan selama 5 menit. Setelah divortex larutan tersebut ditambahkan AlCl_3 10% sebanyak 0,3 ml, NaOH 1 M sebanyak 2 ml, dan ditambahkan aquadest hingga volume total 10 ml. Tahap selanjutnya larutan dihomogenkan dan didiamkan selama 5 menit. Absorbansi diukur dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 352 nm.

3.5.3.3 Penetapan Kadar Total Flavonoid Ekstrak Kalus Kesambi

Ekstrak kalus kesambi pada masing-masing konsentrasi dipipet sebanyak 1 ml. Kemudian, ditambahkan aquadest sebanyak 4 ml dan ditambahkan NaNO_3 5% sebanyak 0,3 ml kemudian larutan divortex dan didiamkan selama 5 menit. Larutan tersebut kemudian ditambahkan AlCl_3 10% sebanyak 0,3 ml, NaOH 1 M sebanyak 2 ml dan ditambah aquadest hingga volume total 10 ml. Kemudian larutan dicampurkan sampai homogen dan didiamkan selama 5 menit. Larutan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometri UV-Vis dengan panjang gelombang 352 nm. Kadar flavonoid diperoleh sebagai mg ekuivalen kuersetin/g ekstrak (mg QE/g).

3.5.3.4 Perhitungan Kandungan Flavonoid

Uji flavonoid kalus kesambi diperoleh dengan melalui rumus sebagai berikut (Juan, 2010):

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

C menunjukkan Kandungan flavonoid total pada ekstrak kesambi tanaman (mg/g) ; c sebagai konsentrasi kuersetin dari kurva standar (mg/L); V menunjukkan volume ekstrak tumbuhan dan m adalah berat ekstrak kesambi murni.

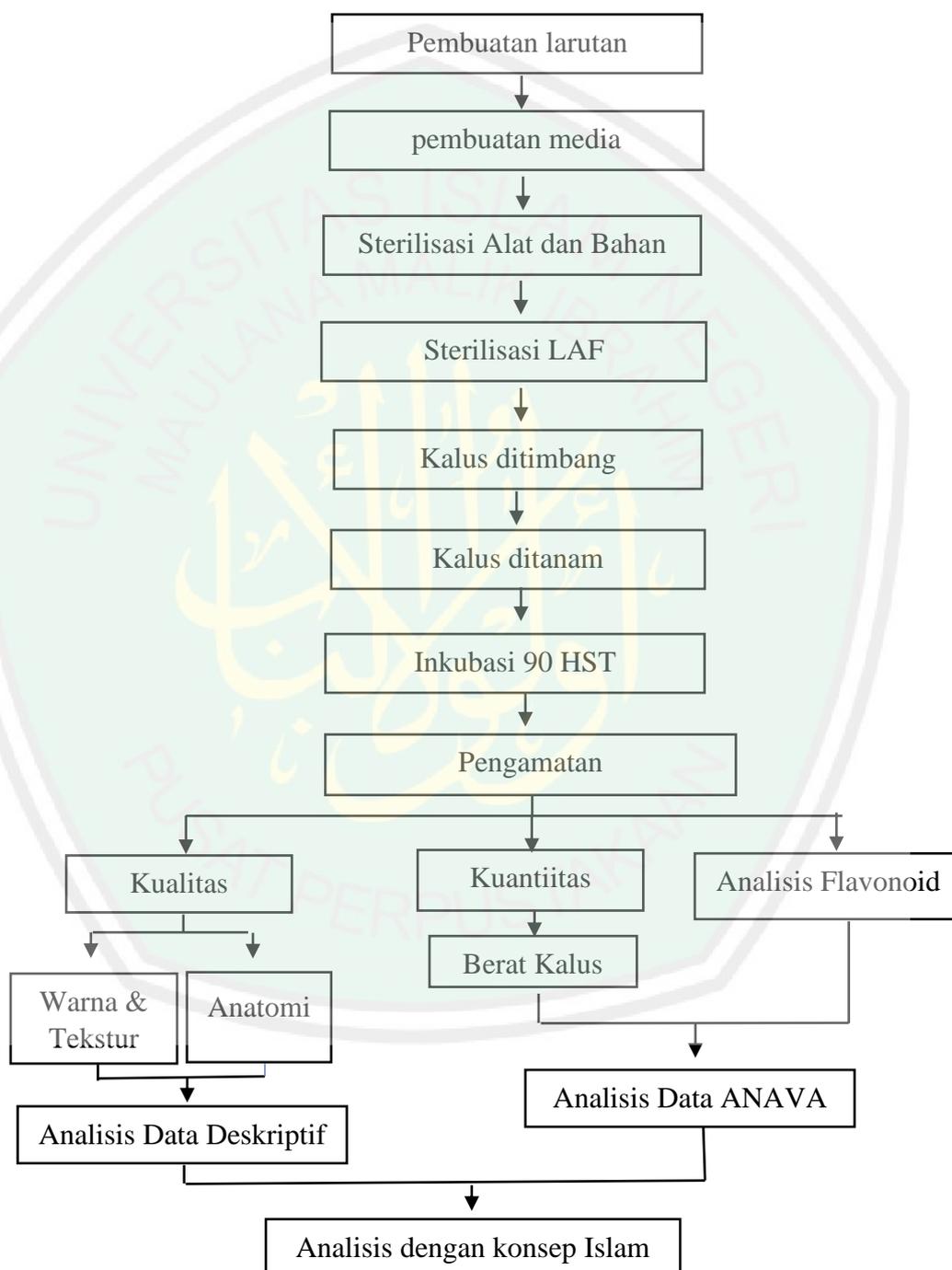
3.6 Analisis Data

Analisis data yang digunakan yaitu analisis secara deskriptif dan analisis variansi (ANOVA). Analisis deskriptif meliputi data kualitatif dengan mengamati tekstur kalus, warna kalus, dan anatomi kalus. Sedangkan analisis menggunakan ANOVA meliputi data kuantitatif dengan mengukur berat kalus dan uji kandungan flavonoid. Apabila dalam menguji terdapat perbedaan maka diuji lanjut dengan DMRT taraf 5%.

Pengambilan data hasil penelitian selain dianalisis menggunakan analisis variansi (ANOVA) juga dilakukan analisis menggunakan integrasi yang mengarah ke Sains dan Islam. Analisis integrasi Sains dan Islam berpegang pada Al-Qur'an dan Hadist sebagai pedoman hidup manusia yang beragama muslim yang disesuaikan dengan ilmu pengetahuan dan pandangan dalam Islam. Analisis ini dilakukan dengan tujuan sebagai petunjuk manusia sebagai khalifah di bumi yang memiliki akal untuk berfikir dalam menjaga dan merawat segala sesuatu yang telah diciptakan oleh Allah SWT yang telah tersedia di bumi melalui penelitian ilmuwan Islam.

3.7 Tahapan Penelitian

Penelitian yang berjudul “ Pengaruh Kitosan Terhadap Kandungan Flavonoid pada Kalus Kesambi (*Schleichera oleosa* (Lour.) Merr) Secara *In Vitro*” melalui beberapa tahap penelitian seperti yang telah disajikan pada gambar 3.2.



Gambar 3.2 Alur Tahapan Penelitian

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pengaruh Konsentrasi Kitosan Terhadap Kualitas dan Kuantitas Subkultur Kalus Kesambi (*Schleichera oleosa* (Lour.) Merr) secara *in vitro*

4.1.1 Pengaruh Konsentrasi Kitosan Terhadap Kualitas (Warna, Tekstur, dan Anatomi) Subkultur Kalus Kesambi (*Schleichera oleosa* (Lour.) Merr)

Kualitas kalus kesambi dalam penelitian ini ditentukan melalui warna dan tekstur kalus. Hal ini dijelaskan menurut Indah (2013) bahwa kalus dapat dilihat secara visual melalui pengamatan warna dan tekstur kalus yang dapat menunjukkan kalus masih aktif membelah atau selnya telah mati. Berdasarkan hasil pengamatan pada penelitian ini, warna kalus menghasilkan warna yang berbeda pada setiap media perlakuan konsentrasi kitosan, namun tekstur kalus menunjukkan hasil yang sama pada semua perlakuan. Warna kalus yang berbeda-beda, menurut Hendaryono (1994) dapat dipengaruhi oleh intensitas cahaya, bagian eksplan pada saat pemotongan dan pigmentasi. Hasil pengamatan pengaruh konsentrasi kitosan terhadap kualitas (warna dan tekstur) Subkultur Kalus Kesambi dapat dilihat pada tabel 4.1.

Tabel 4.1 Hasil Pengamatan Pengaruh Konsentrasi Kitosan Terhadap Kualitas (Warna dan Tekstur) Subkultur Kalus Kesambi (*Schleichera oleosa* (Lour.) Merr) pada hari ke 90 HST.

No.	Perlakuan	Gambar Pengamatan	Warna Kalus	Tekstur Kalus
1.	Kitosan 0 mg/l		Kecoklatan	Kompak
2.	Kitosan 0,5 mg/l		Kecoklatan	Kompak

3.	Kitosan 1 mg/l		Kecoklatan	Kompak
4.	Kitosan 1,5 mg/l		Hijau Kecoklatan	Kompak
5.	Kitosan 2 mg/l		Hijau Kecoklatan	Kompak
6.	Kitosan 2,5 mg/l		Hijau	Kompak

Tabel 4.1 menunjukkan hasil pengamatan pada kalus kesambi dengan konsentrasi kitosan yang berbeda-beda pada hari terakhir ke 90 HST karena pada hari tersebut memasuki fase stasioner (pertumbuhan dan ukuran tetap). Pada awal perlakuan subkultur kalus kesambi memiliki warna yang seragam yaitu hijau. Hasil yang berbeda ditunjukkan pada akhir pengamatan yaitu warna mengalami perubahan pada setiap konsentrasi. Pada perlakuan kitosan konsentrasi 0 mg/l, 0,5 mg/l, dan 1 mg/l menunjukkan kalus yang berwarna kecoklatan. Kalus yang

berwarna coklat menandakan kalus semakin tua dan sebagian sel-selnya mengalami kematian. Menurut Rashid, *et al* (2009) bahwa pada masa pertumbuhan kalus akan membentuk warna hijau, namun semakin tua umur kalus kualitas kalus mengalami penurunan sehingga membentuk warna kecoklatan dan mati. Hal ini juga dijelaskan oleh Abiri, *et al* (2017) penurunan kualitas pada kalus non-embriogenik disebabkan karena umur simpan kalus yang terlalu lama sehingga menyebabkan kalus berwarna kecoklatan dan sel-selnya mengalami kematian.

Perlukaan pada saat pemotongan kalus juga merupakan sebab kalus mengalami pencoklatan. Menurut Sitinjak, *et al* (2015) permukaan kalus mengalami pembengkakan karena terjadinya perlukaan pada saat proses inisiasi sehingga menghasilkan respon pencoklatan pada kalus. Kartika, *et al* (2014) menerangkan bahwa respon pencoklatan karena perlukaan pada kalus menunjukkan kalus mengalami kerusakan sel. Hal ini diperkuat oleh Hutami (2008) bahwa oksidasi yang terjadi didalam sel mengakibatkan terakumulasinya senyawa fenol di dalam sel kalus sehingga kalus mengalami kerusakan dan kalus menjadi kecoklatan. Pencoklatan terjadi karena enzim dan substrat keluar dari sel setelah terjadinya perlukaan pada kalus sehingga meningkatkan aktivitas fenilalanin amonia liase (PAL) sebagai agen untuk memproduksi fenilpropanoid.

Hasil yang berbeda ditunjukkan pada perlakuan kitosan konsentrasi 1,5 mg/l dan 2 mg/l menghasilkan kalus yang berwarna hijau kecoklatan. Kalus yang berwarna hijau kecoklatan menunjukkan bahwa kalus masih tumbuh cukup baik dan sebagian sel-selnya mengandung metabolit sekunder karena terjadi pencoklatan, namun kualitas kalus mengalami penurunan. Menurut Adri (2012) kualitas kalus mengalami penurunan karena terbentuknya senyawa fenolik pada kalus yang menyebabkan kalus berwarna hijau kecoklatan. Hal ini juga dijelaskan oleh Sa'diyah (2019) bahwa kalus yang berwarna hijau kecoklatan pada delima hitam disebabkan oleh kandungan senyawa fenol yang tinggi dan sel kalus kehilangan air. Harahap (2005) menerangkan bahwa warna kalus yang berubah menjadi kecoklatan karena kalus memasuki fase stasioner. Pada fase ini terjadi akumulasi metabolit sekunder di dalam sel.

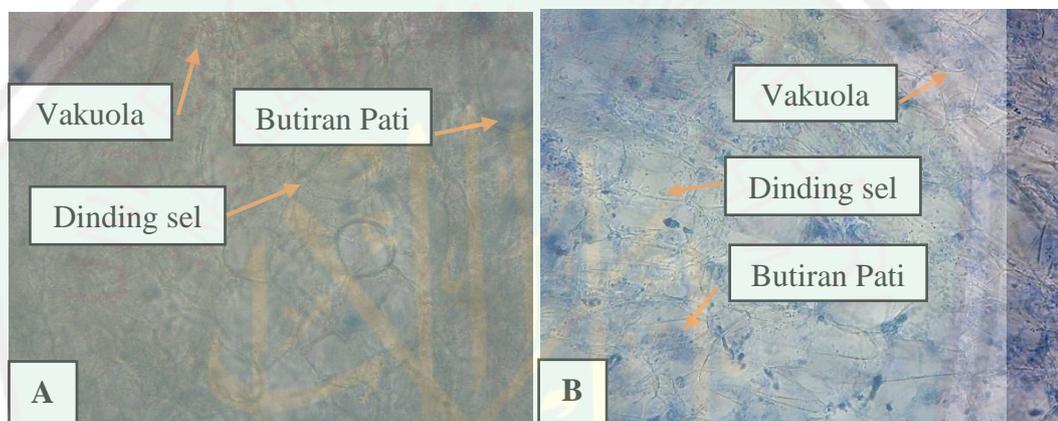
Pemberian elisitor berupa kitosan pada media perlakuan dapat menyebabkan warna kalus menjadi hijau kecoklatan sebagai respon pertahanan diri pada kalus. Menurut Kim, *et al* (2005) bahwa kitosan merupakan kelompok elisitor biotik yang ditambahkan dalam media kultur sel tanaman karena dapat menginduksi metabolit sekunder. Metabolit sekunder yang dihasilkan oleh tanaman merupakan respon pertahanan diri yang dikeluarkan oleh sel secara alami. Kitosan ditambahkan dalam media karena dapat meningkatkan biosintesis flavonoid. Hal ini juga dijelaskan oleh Khan, *et al* (2002) kitosan sebagai kunci enzim jalur fenilpropanoid dalam menghasilkan PAL dalam biosintesis flavonoid yang berguna untuk mengaktifkan enzim sebagai upaya respon pertahanan diri sel dengan mengeluarkan senyawa metabolit sekunder.

Sedangkan pada perlakuan kitosan konsentrasi 2,5 mg/l menghasilkan kalus yang berwarna hijau. Warna hijau pada kalus dapat disebabkan adanya kandungan klorofil di dalam kalus. Menurut Fatmawati (2008) kalus dengan ciri-ciri berwarna hijau dapat menunjukkan keberadaan klorofil di dalamnya. Klorofil yang terdapat pada kalus menunjukkan kalus melakukan proses fotosintesis. Proses fotosintesis pada kalus dapat disebabkan oleh beberapa faktor salah satunya cahaya. Hal ini dijelaskan oleh Ariani, *et al* (2016) dalam jurnalnya bahwa cahaya yang tercukupi dapat membantu proses fotosintesis pada kalus sehingga menghasilkan kalus yang berwarna hijau. Selain itu, pemberian kitosan pada media perlakuan juga merupakan faktor terjadinya fotosintesis. Menurut Kaimudin dan Maria (2016) bahwa pemberian kitosan dalam kadar tertentu dapat mempermudah dalam penyerapan unsur hara, meningkatkan kekuatan tanaman, meningkatkan perkecambahan, dan dapat meningkatkan fotosintesis.

Berdasarkan hasil pengamatan pada kalus dengan perlakuan kitosan dengan konsentrasi berbeda menunjukkan hasil yang sama, yaitu tekstur kalus kompak. Kalus kompak memiliki tekstur padat dan tidak mudah dipisahkan. Selain itu, kalus yang bertekstur kompak menunjukkan adanya kandungan metabolit sekunder. Menurut Sari, *et al* (2018) bahwa kalus dengan tekstur tidak gembur, memiliki bentuk yang padat dan rapat merupakan karakteristik dari kalus kompak. Chorabik and Pietrzykowski (2019) menyatakan bahwa penambahan elisitor pada media

kalus dapat mengakumulasi metabolit sekunder sehingga kalus memiliki warna coklat dengan tekstur kalus kompak. Rahmawati (1999) menambahkan bahwa tingginya kandungan metabolit sekunder pada kalus kompak menyebabkan terjadinya penurunan pada proses pembelahan sel sehingga kalus memiliki tekstur yang padat.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, anatomi kalus kesambi yang telah diinduksi elisitor berupa kitosan dengan pemberian konsentrasi yang berbeda-beda diamati dengan perbesaran 400x menggunakan mikroskop. Anatomi kalus kesambi yang telah diamati dapat dilihat pada gambar 4.1.



Gambar 4.1 Hasil Pengamatan anatomi kals Kesambi dengan menggunakan mikroskop.
A. Kompak (kitosan 0 mg/l) B. Kompak (kitosan 2,5 mg/l)

Hasil pengamatan pada anatomi kalus dengan pemberian konsentrasi kitosan yang bervariasi menunjukkan hasil yang sama yaitu pada perlakuan dengan konsentrasi 0 mg/l, 0,5 mg/l, 1 mg/l, 1,5 mg/l, 2 mg/l, dan 2,5 mg/l menunjukkan tekstur yang kompak. Karakteristik dari kalus yang bertekstur kompak yaitu inti tidak terlihat, mengandung butiran pati, memiliki vakuola yang besar, dan selnya tersusun rapat.

Hal ini didukung oleh Mostafiz and Wagiran (2018) bahwa kalus terdiri atas dua macam yaitu kalus embriogenik dan kalus non-embriogenik. Kalus embriogenik digunakan untuk memperbanyak sedangkan kalus non-embriogenik digunakan untuk meningkatkan metabolit sekunder. Kalus non-embriogenik memiliki tekstur kalus yang kompak, aktivitas metabolisme yang tinggi, banyak

mengandung pati, dan memiliki vakuola yang besar. Pendapat yang sama dijelaskan Ibaraki and Kurata (2001) bahwa kalus non-embriogenik memiliki sel yang vakuolanya besar. Hal ini juga dijelaskan oleh Street and Smith (1974) bahwa kalus *non freeable* mempunyai dinding polisakarida yang besar sehingga memiliki vakuola yang besar, selain itu, memiliki tekstur kalus yang kompak sehingga antar selnya tersusun padat dan rapat sehingga sulit dipisahkan.

Kalus non-embriogenik memiliki vakuola yang besar. Pada sel, vakuola berperan sebagai tempat menyimpan cadangan makanan seperti karbohidrat dan lipid (Cangahu-ala-Inocente, *et al*, 2004). Senyawa metabolit sekunder seperti flavonoid dan antosianin disimpan di dalam vakuola (Peer, *et al*, 2001). Menurut Resmianty (2012) vakuola merupakan sel yang terdiri atas rongga-rongga besar yang diisi dengan cairan vakuola. Cairan vakuola sendiri terdiri atas sekumpulan bahan organik hasil samping dari proses metabolisme atau penyimpan cadangan makanan. Vakuola menyerap banyak menyerap bahan-bahan sehingga vakuola menjadi membesar. Menurut Abidin (1990) air disimpan lebih banyak pada kalus yang memiliki vakuola besar daripada vakuola yang berukuran kecil. Aboshama, *et al* (2018) dalam penelitiannya bahwa kalus non-embriogenik yang berasal dari daun pada leci (*Litchi chinensis*) menunjukkan inti sel relatif kecil hampir tidak terlihat. Hal ini menunjukkan ciri-ciri dari kalus yang memiliki tekstur kompak.

4.1.2 Pengaruh Konsentrasi Kitosan Terhadap Kuantitas Subkultur Kalus Kesambi (*Schleichera oleosa* (Lour.) Merr)

Hasil penelitian pemberian kitosan dengan konsentrasi berbeda terhadap berat kalus diuji menggunakan uji variasi ANAVA. Dalam penelitian ini, uji normalitas menggunakan uji *Shapiro-wilk*. Uji *Shapiro-Wilk* merupakan uji normalitas dengan jumlah sampel perlakuan <50 . Menurut Dahlan (2010) uji normalitas dibagi menjadi dua yaitu menggunakan uji *Kolmogorov-Smirnov* atau uji *Saphiro-Wilk*. Uji *Kolmogorov-Smirnov* digunakan apabila jumlah sampel dalam jumlah besar atau >50 . Sedangkan uji *Saphiro-Wilk* digunakan apabila jumlah sampel dalam jumlah kecil atau <50 . Pada uji *Saphiro-Wilk* hasil perhitungan berdistribusi normal apabila $\text{sig} > 0,05$. Penelitian ini menggunakan 6

perlakuan dengan 4 ulangan sehingga total perlakuan sejumlah 24 sampel. Maka, uji normalitas yang digunakan yaitu uji *Saphiro-Wilk*.

Berdasarkan tabel output hasil perhitungan normalitas menggunakan SPSS didapatkan hasil bahwa nilai Sig pada setiap konsentrasi berbeda-beda. Sig untuk konsentrasi 0 mg/l yaitu 0,704, sig untuk konsentrasi 0,5 mg/l yaitu 0,911, sig untuk konsentrasi 1 mg/l yaitu 0,689, sig untuk konsentrasi 1,5 mg/l yaitu 0,241, sig untuk konsentrasi 2 yaitu 0,740, dan sig untuk konsentrasi 2,5 yaitu 0,341. Karena nilai sig dari keenam perlakuan $>0,05$, maka atas dasar pengambilan keputusan pada uji normalitas *Saphiro-Wilk* maka dapat disimpulkan bahwa data di atas berdistribusi normal sehingga dapat dilanjutkan uji homogenitas.

Uji homogenitas adalah data pembanding yang bersifat homogen. Menurut Widiyanto, (2010) pengambilan keputusan dalam uji homogenitas yaitu apabila nilai signifikansi atau Sig $<0,05$ maka data tidak homogen sedangkan apabila nilai signifikansi atau Sig $>0,05$ maka data dapat dikatakan homogen. Berdasarkan hasil penelitian, uji homogenitas terhadap rata-rata berat kalus menunjukkan nilai signifikansi atau nilai Sig yaitu 0,094, maka dapat dikatakan bahwa data tersebut homogen. Data yang homogen dapat dilanjutkan dengan melihat hasil analisis variansi (ANOVA). Hasil analisis variansi (ANOVA) menunjukkan dengan pemberian konsentrasi kitosan yang berbeda-beda dapat berpengaruh nyata terhadap kalus kesambi (*Schleichera oleosa* (Lour.) Merr). Hasil perhitungan ANOVA dapat dilihat dalam tabel 4.2.

Tabel 4.2 Ringkasan Hasil Analisis Variasi (ANOVA) Pengaruh Pemberian Kitosan Terhadap Rata-Rata Berat Kalus

Variabel Pengamatan	F Hitung	F Tabel 5%
Berat Kalus	18.388	2.773

Berdasarkan hasil di atas, perhitungan ANOVA pemberian kitosan dengan konsentrasi berbeda menunjukkan hasil yang signifikan terhadap rata-rata berat kalus kesambi. Hal ini dapat dilihat dari nilai F hitung lebih besar daripada F tabel 5% sehingga dapat dilakukan uji lanjut dengan menggunakan uji Duncan Multiple Range Test (DMRT) 5%. Hasil Uji lanjut DMRT dapat dilihat pada tabel 4.3.

Tabel 4.3 Hasil Uji DMRT Pengaruh pemberian konsentrasi Kitosan Terhadap Rata-Rata Berat Kalus

No.	Konsentrasi Kitosan (mg/l)	Berat (g)
1.	0	0,23a
2.	0,5	0,27ab
3.	1	0,30bc
4.	1,5	0,36cd
5.	2	0,41de
6.	2,5	0,47e

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dengan pemberian konsentrasi kitosan yang berbeda-beda menunjukkan rata-rata berat kalus yang berbeda. Semakin tinggi pemberian konsentrasi kitosan menunjukkan peningkatan rata-rata berat kalus. Pada konsentrasi kitosan 0 mg/l menghasilkan rata-rata berat kalus sebesar 0,23 gram. Pada konsentrasi kitosan 0,5 mg/l menghasilkan rata-rata berat kalus sebesar 0,27 gram. Pada konsentrasi kitosan 1 mg/l menghasilkan rata-rata berat kalus sebesar 0,30 gram. Pada konsentrasi kitosan 1,5 mg/l menghasilkan rata-rata berat kalus sebesar 0,36 gram. Pada konsentrasi kitosan 2 mg/l menghasilkan rata-rata berat kalus sebesar 0,41 gram. Kalus dengan perlakuan kitosan 2,5 mg/l memberikan hasil rata-rata berat kalus terbaik sekitar 0,47 gram.

Menurut Ruswaningsih (2007) Kalus yang memiliki rata-rata berat kalus tinggi disebabkan oleh adanya kandungan karbohidrat dan air. Membesarnya volume kalus tergantung dari kemampuan sel untuk membelah. Faktor lainnya yaitu dari kecepatan sel-sel untuk membelah (Indah dan Ermavitalini, 2013). Hal ini juga dikemukakan oleh Rahayu, *et al* (2003) bahwa kandungan air yang tinggi menyebabkan besarnya berat segar kalus, selain adanya kandungan air, besarnya berat segar kalus juga disebabkan oleh proses pembelahan sel secara terus menerus. Menurut Salisbury and Ross (1995) peningkatan jumlah dan ukuran sel menandakan bahwa kalus mengalami pertumbuhan. Pembelahan pada sel yang tidak terkendali akibat dari hasil proliferasi sel-sel induk sehingga memicu pertumbuhan kalus. Pemberian elisitor berupa kitosan dapat mempengaruhi proses pembelahan pada sel. Menurut Mawgoud (2010) kitosan mengandung gugus amina,

keberadaan gugus amina pada kitosan dapat membantu dalam proses organogenesis dan pembelahan sel pada tanaman.

Berdasarkan hasil penelitian, berat kalus kesambi pada setiap perlakuan kitosan dengan konsentrasi yang berbeda-beda mengalami peningkatan pada setiap konsentrasinya. Meningkatnya rata-rata berat kalus dapat disebabkan karena adanya kandungan kitosan. Menurut Uthairatanakij, *et al* (2007) pemberian elisitor kitosan dalam media perlakuan dapat meningkatkan sinyal untuk sintesis hormon tanaman seperti giberelin dan auksin. Dalam meningkatkan pertumbuhan dan perkembangan tanaman kitosan akan memberikan sinyal pada jalur independen triptofan dalam proses biosintesis auksin. Hal ini juga dijelaskan oleh Trimulyadi (2007) bahwa kitosan mengandung berbagai hormon yang dibutuhkan dalam proses pertumbuhan yaitu terdiri atas hormon sitokinin (zeatin) 18,46 ppm, auksin (IAA) 319,11 ppm, dan giberelin (GA₃) 252,48 ppm per liter larutan kitosan.

Menurut Wattimena (1991) bahwa hormon auksin dapat meningkatkan berat basah kalus, berat basah yang meningkat tersebut disebabkan oleh kemampuan sel dalam menyerap air. Selain itu, auksin juga berperan dalam pembesaran sel dan elongasi sel. Hormon auksin dalam kerjanya dapat membantu merubah aktivitas enzim-enzim yang berkerja dalam sintesis komponen-komponen dinding sel dan suatu matriks dinding sel yang utuh dapat menyusun kembali sehingga berpengaruh terhadap berat sel (Abidin, 1990). Hal ini juga dijelaskan oleh Sriyani dan Wijayani (1994) bahwa hormon auksin dapat menaikkan volume sel, meningkatnya volume sel disebabkan oleh terjadinya peningkatan permeabilitas sel yang diikuti menurunnya tekanan dinding sel sehingga air dapat masuk ke dalam sel. Selain itu, auksin juga berperan dalam peningkatan sintesis protein dan tekanan osmotik.

Kitosan sebagai elisitor tidak hanya mengandung hormon auksin, tetapi juga mengandung hormon sitokinin dan giberelin. Menurut Ariani, *et al* (2014) hormon giberelin dapat memacu perpanjangan ruas batang, peningkatan besaran daun, membantu dalam inisiasi pertumbuhan. Peran lain hormon giberelin yaitu membantu dalam proses pembesaran sel dan pembelahan sel. Selain hormon giberelin, hormon sitokinin juga dapat memacu pembelahan sel (Taiz and Zeiger,

2002). Adanya hormon sitokinin dalam tumbuhan mampu merangsang diferensiasi sel-sel pertumbuhan, perluasan daun, mendorong pertumbuhan tunas samping, dominasi apikal, dan memacu pembelahan sel. Sitokinin dalam kerjanya membantu proses sitokinesis yaitu pada saat proses sintesis RNA dan protein akan memacu aktivitas auksin sehingga membantu dalam proses pembelahan sel pada kalus (Syahid, *et al*, 2010). Menurut Lakitan (1996) siklus sel dalam memperbanyak diri pada setiap tumbuhan berbeda-beda hal ini tergantung dari kepekaan sel terhadap keberadaan ZPT sehingga waktu pembelahan setiap sel tidak sama. Terdapat faktor lain yang mempengaruhi pembelahan sel yaitu dari kemampuan sel tersebut dalam menyerap zat-zat hara yang tersedia.

Kitosan dalam kerjanya juga mampu mengaktifkan sel, selain itu kitosan juga mampu meningkatkan pertahanan dalam melawan serangga dan penyakit, kitosan juga mampu menyebabkan ekskresi enzim pelawan dan mengatur sistem kekebalan tanaman (Boonlertnirun, *et al*, 2008). Menurut Chandkrachang, *et al*, 2005) bahwa kitosan berperan dalam kehidupan sel hewan dan sel tumbuhan. Dalam sel tumbuhan kitosan dapat memperbarui sumber nutrisi dan biokompatibel.

4.2 Pengaruh Konsentrasi Kitosan Terhadap Kadar Flavonoid Kalus Kesambi (*Schleichera oleosa* (Lour.) Merr)

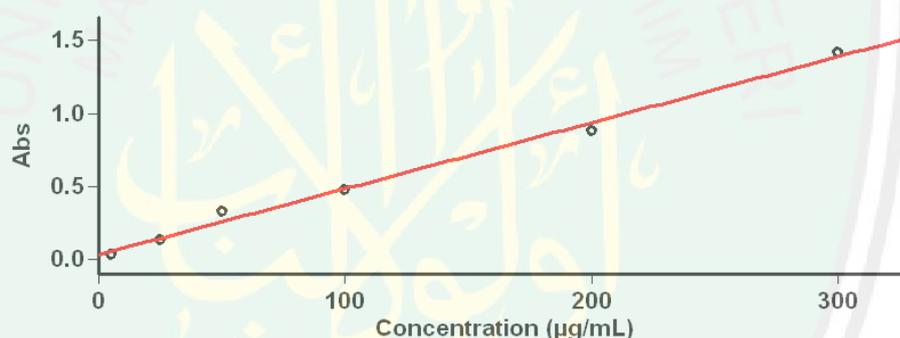
Kadar senyawa flavonoid pada kalus kesambi diuji secara kuantitatif dengan panjang gelombang yang telah ditentukan yaitu 352 nm menggunakan alat spektrofotometri UV-Vis. Penentuan kadar flavonoid dapat diketahui dengan menggunakan larutan standar terlebih dahulu. Larutan standar yang digunakan yaitu kuersetin. Kuersetin adalah salah satu flavonol yang termasuk ke dalam senyawa aktif flavonoid yang banyak dijumpai dalam buah-buahan dan sayur-sayuran. Kuersetin memiliki gugus hidroksil pada C3 atau C5 dan gugus keto pada C4. Larutan standar kuersetin digunakan karena sangat aktif sebagai antioksidan di alam dan paling banyak ditemukan di alam (Arifin dan Ibrahim 2018). Konsentrasi larutan standar kuersetin yang digunakan dalam penelitian ini terdiri atas 5 ppm, 25 ppm, 50 ppm, 100 ppm, 200 ppm, dan 300 ppm. Masing-masing konsentrasi diukur nilai absorbansinya menggunakan spektrofotometri UV-Vis dengan panjang

gelombang 352 nm dan dibuat dalam grafik untuk mengetahui hubungan antara konsentrasi kuersetin dengan nilai absorbansi dapat dilihat pada tabel 4.4.

Tabel 4.4 Hasil dari hubungan konsentrasi kuersetin dengan nilai absorbansi.

No.	Konsentrasi (ppm)	Nilai Absorbansi (y)
1.	5	0,0375
2.	25	0,1314
3.	50	0,3281
4.	100	0,4777
5.	200	0,8823
6.	300	1,4191

Gambar 4.2 Hasil grafik kurva larutan standar kuersetin



Calibration eqn
Correlation Coefficient

Abs = 0.00452*Conc +0.03399
0.99318

Kurva kalibrasi di atas adalah hasil dari pengukuran konsentrasi larutan standar dengan nilai absorbansinya sehingga dapat ditarik kesimpulan bahwa konsentrasi larutan standar yang semakin tinggi maka nilai absorbansi yang dihasilkan juga semakin meningkat. Kurva kalibrasi berfungsi sebagai pembandingan dalam menentukan kadar senyawa flavonoid total dengan menghubungkan konsentrasi dengan nilai absorbansi. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, persamaan dari kurva baku kuersetin adalah $Abs = 0,00452 \times Cons + 0,03399$ dengan koefisien korelasinya 0,99318. Persamaan kurva baku kuersetin ini digunakan untuk menghitung kadar senyawa flavonoid total pada masing-masing konsentrasi kalus. Menurut Harmita (2004) persamaan regresi kadar total flavonoid

(x) dihitung dengan persamaan $y=ax+b$ dan kriteria yang memenuhi untuk dilakukan uji yaitu apabila koefisien korelasinya lebih dari 0,98.

Berdasarkan hasil dari pengukuran kadar flavonoid total pada kalus kesambi menunjukkan bahwa pada semua konsentrasi kitosan yaitu 0 mg/l, 0,5 mg/l, 1 mg/l, 1,5 mg/l, 2 mg/l, dan 2,5 mg/l mengandung senyawa flavonoid, namun hasil yang didapatkan berbeda-beda pada setiap konsentrasinya. Hasil dari perhitungan kadar total flavonoid pada sampel dapat dilihat pada tabel 4.5.

Tabel 4.5 Kadar total flavonoid kalus kesambi dengan pemberian kitosan

No.	Konsentrasi Kitosan (mg/l)	Kadar total flavonoid ($\mu\text{g QE/g}$)
1.	0	125,09
2.	0,5	206,15
3.	1	182,59
4.	1,5	153,96
5.	2	72,26
6.	2,5	230,05

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan penambahan kitosan dengan konsentrasi yang berbeda menghasilkan hasil yang berbeda-beda. Kitosan dengan konsentrasi 0,5 mg/l mengalami kenaikan sebesar 64%. Penambahan konsentrasi kitosan 1 mg/l mengalami kenaikan sebesar 45%. Penambahan konsentrasi kitosan 1,5 mg/l mengalami kenaikan sebesar 23%. Penambahan konsentrasi kitosan 2 mg/l mengalami penurunan sebesar 42%. Kemudian penambahan konsentrasi kitosan 2,5 mg/l mengalami kenaikan sebesar 83%. Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan menggunakan kontrol positif berupa daun kesambi menunjukkan hasil kadar flavonoid total sebesar 600 $\mu\text{g QE/g}$.

Hasil penelitian diatas menunjukkan bahwa pada kalus dengan konsentrasi yang berbeda menghasilkan hasil yang berbeda pula. Penambahan kitosan konsentrasi 0,5 mg/l, 1 mg/l, 1,5 mg/l menunjukkan kenaikan dibandingkan dengan konsentrasi 0 mg/l sebagai kontrol dan mengalami kenaikan pada kitosan konsentrasi 2,5 mg/l. Namun, pemberian kitosan pada kalus kesambi menghasilkan kadar flavonoid total lebih rendah dibandingkan dengan kontrol berupa daun

kesambi. Faktor yang menyebabkan tingginya kadar flavonoid pada daun kesambi dan kadar flavonoid kalus kesambi berbeda adalah masa panen yang terlalu lama yaitu 90 HST. Pada 90 HST perkembangan kalus mengalami fase stasioner. Fase stasioner menunjukkan perkembangan kalus mengalami penurunan karena sebagian sel-selnya mengalami kematian. Waktu yang tepat dalam masa panen kalus yaitu pada waktu 45 HST yaitu pada fase linier. Selain itu, daun memiliki kadar klorofil lebih tinggi daripada kalus yang ditandai dengan daun yang lebih hijau.

Kalus mengalami beberapa fase pertumbuhan yaitu fase lag, pada fase ini kalus mengawali proses pembelahan sel, fase kedua yaitu fase eksponensial dimana pada fase ini laju pembelahan sel mengalami peningkatan, fase ketiga yaitu fase linier, yaitu dari fase pembelahan sel mulai mengalami perlambatan namun laju perkembangan sel terus meningkat, fase keempat yaitu fase perlambatan, pada fase ini proses pembelahan dan pemanjangan sel mengalami penurunan, dan fase yang terakhir yaitu fase stasioner dimana jumlah dan ukuran sel tetap dan mengalami penurunan (Purnamaningsih dan Misky 2011). Berdasarkan hasil penelitian Abbade, *et al* (2010) bahwa pada pertumbuhan kalus *Tabebuia roseo alba* (Ridl.) Sand ditentukan melalui fase-fase pertumbuhan yang dibentuk dalam sebuah kurva. Pada fase linier yaitu pada 45 HST kalus mulai mengurangi proses pembelahan namun, meningkatkan perluasan sel. Peningkatan kandungan flavonoid pada kalus delima hitam (*Punica granatum* L.) meningkat pada 42 HST menghasilkan flavonoid tertinggi pada konsentrasi PEG 5% (Sa'diyah, 2019). Penelitian yang dilakukan oleh Sangeetha, *et al* (2016) bahwa peningkatan kandungan fenol pada kalus *Pseudarthria viscida* L. Meningkat pada 48 HST menghasilkan fenol tertinggi pada konsentrasi kitosan 1,5 mg/l.

Faktor lain yang menyebabkan kadar flavonoid daun kesambi lebih tinggi dibandingkan kalus kesambi karena proses uji kadar flavonoid menggunakan alat spektrofotometri UV-Vis. Proses kerja dari alat ini didasarkan pada interaksi antara materi dan cahaya. Kadar flavonoid hasil uji menggunakan spektrofotometri UV-Vis didapat dari warna yang terpancar dari daun maupun kalus. Semakin gelap konsentrasi warna maka semakin menunjukkan cahaya tampak. Hal ini dijelaskan

oleh Yanlinastuti dan Syamsul (2016) prinsip kerja spektrofotometri Uv-Vis yaitu apabila cahaya monokromatik melalui suatu media (larutan), maka sebagian cahaya tersebut diserap (I), sebagian dipantulkan (I_r), dan sebagian lagi dipancarkan (I_t). Aplikasi rumus tersebut dalam pengukuran kuantitatif dilaksanakan dengan cara komparatif menggunakan kurva kalibrasi dari hubungan konsentrasi deret larutan alat untuk analisa suatu unsur yang berkadar rendah baik secara kuantitatif maupun secara kualitatif, pada penentuan secara kualitatif berdasarkan puncak-puncak yang dihasilkan spektrum dari suatu unsur tertentu pada panjang gelombang tertentu, sedangkan penentuan secara kuantitatif berdasarkan nilai absorbansi yang dihasilkan dari spektrum dengan adanya senyawa pengompleks sesuai yang dianalisisnya. Absorbansi adalah perbandingan intensitas sinar yang diserap dengan intensitas sinar datang. Nilai absorbansi ini akan bergantung pada kadar zat yang terkandung dalam suatu sampel maka semakin banyak molekul yang akan menyerap cahaya pada panjang gelombang tertentu sehingga nilai absorbansi semakin besar atau dengan kata lain nilai absorbansi akan berbanding lurus dengan konsentrasi zat yang terkandung didalam suatu sampel. Absorbansi sebagai analisa kuantitatif dilakukan berdasarkan Hukum Lambert-Beer. Hukum Lambert-Beer berbunyi “ Jumlah radiasi cahaya tampak (ultraviolet, inframerah, dan sebagainya) yang diserap atau ditransmisikan oleh suatu larutan merupakan fungsi eksponen dari konsentrasi zat dan tebal larutan (Neldawati, *et al*, 2013).

Kandungan klorofil yang berbeda pada daun dan kalus kesambi menunjukkan hasil kadar flavonoid yang berbeda pula. Sel-sel yang berkembang pada daun sudah mengalami beberapa fase perkembangan dan terpapar cahaya matahari lebih lama, sehingga kadar klorofil yang dihasilkan lebih besar. Hal ini dijelaskan oleh Peri, *et al* (2009) bahwa struktur morfologi dan anatomi daun merupakan salah satu proses adaptasi yang dilakukan tumbuhan terhadap intensitas cahaya yang berbeda. Hal ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan tumbuhan dalam melakukan penyerapan cahaya optimal dan melakukan proses fotosintesis secara efisien (Taiz dan Zeiger, 2010). Hal ini diperkuat oleh pendapat Lawendatu, *et al* (2019) bahwa kandungan klorofil dalam satu tumbuhan berbeda-beda sesuai dengan porsi daun tersebut, misalnya pada daun yang terpapar atau lebih banyak

mendapatkan cahaya matahari mempunyai klorofil yang lebih banyak dibandingkan dengan daun yang kurang mendapat cahaya matahari. Sedangkan sel-sel yang berkembang pada kalus merupakan sekumpulan sel-sel pemula atau sel yang pertama berkembang. Kalus dalam proses fotosintesisnya dibantu oleh cahaya lampu. Hal ini dijelaskan oleh Yusnita (2003) bahwa kalus merupakan kumpulan sel yang tidak terorganisasi dan aktif membelah diri karena adanya perlakuan jaringan atau pengkulturan berbagai jaringan tanaman.

Klorofil merupakan faktor utama yang mempengaruhi proses fotosintesis. Fotosintesis adalah proses perubahan senyawa anorganik (CO_2 dan H_2O) menjadi senyawa organik (karbohidrat) dan O_2 dengan bantuan cahaya matahari (Thorpe, 1984). Sifat fisik klorofil adalah menerima dan memantulkan cahaya dengan gelombang yang berlainan. Klorofil banyak menyerap sinar dengan panjang gelombang antara 400-700 nm, terutama sinar merah dan biru. Daun dalam proses fotosintesisnya dibantu oleh cahaya matahari. Cahaya matahari mengandung semua warna spektrum kasat mata dari merah sampai violet. Pada tanaman tingkat tinggi mempunyai dua macam klorofil yaitu klorofil a dan klorofil b. Kedua klorofil ini mampu menyerap cahaya dibagian merah (600-700 nm) dan paling sedikit menyerap cahaya hijau (500-600 nm) (Bahri, 2010). Energi matahari terbentuk dari pusat matahari, energi yang diemisikan dari permukaan matahari dan diterima oleh bumi sekitar 1.73×10^{14} kW, dimana rasionya terdiri dari 9% radiasi ultraviolet (200-400 nm), 41% radiasi cahaya tampak/visible (400-700 nm), dan 50% radiasi infra merah (700-3000 nm) (Kalogirou, 2009). Sedangkan kalus dalam proses fotosintesisnya dibantu oleh cahaya lampu LED. Lampu LED dapat membantu dalam proses fotosintesis karena lampu LED memiliki panjang gelombang antara 570-590 nm (Soeleman dan Donor, 2013). Hal ini diperkuat oleh Fan, *et al* (2013) spektrum cahaya lampu LED berwarna kuning (590 nm), hijau (520 nm), merah (658 nm), dan biru (460 nm). Setiap warna cahaya memiliki panjang gelombang yang berbeda. Semakin panjang gelombang, maka energi yang dikandungnya semakin kecil. Energi cahaya dari tinggi ke rendah berturut-turut adalah infra merah (IR), merah, oranye, kuning, hijau, biru, violet, dan ultra violet (UV) (Suseno, 1974).

Hasil di atas menunjukkan pada konsentrasi kitosan 0 mg/l mengandung senyawa flavonoid total sebesar 125, 09 $\mu\text{g QE/g}$. Hasil tersebut menunjukkan tanpa pemberian konsentrasi kitosan mampu menghasilkan senyawa flavonoid. Adanya kandungan flavonoid pada kalus dapat dipicu oleh keberadaan zat pengatur tumbuh (ZPT) yang ditambahkan pada media. Hal ini didukung oleh pendapat Moko, *et al* (1993) bahwa pemberian zat pengatur tumbuh dengan konsentrasi yang bervariasi dalam media tumbuh akan meningkatkan kandungan metabolit sekunder. Zat pengatur tumbuh dengan pengaplikasian yang tepat memberikan peluang meningkatnya kandungan metabolit sekunder seperti tanin, saponin, alkaloid, dan flavonoid. Selain zat pengatur tumbuh, meningkatnya kandungan metabolit sekunder dapat disebabkan oleh spesies tumbuhan yang dibudidayakan.

Zat pengatur tumbuh yang digunakan dalam penelitian ini yaitu kombinasi antara zat pengatur tumbuh auksin berupa 2,4-D dan zat pengatur tumbuh sitokinin berupa BA dengan masing-masing konsentrasi 1 mg/l. Menurut Becti, *et al* (2003) pembentukan dan pertumbuhan kalus dapat dipicu oleh zat pengatur tumbuh seperti 2,4-D yang berperan dalam merangsang pembesaran dan pembelahan sel. Selain itu juga auksin jenis 2,4-D ini dapat meningkatkan kandungan senyawa metabolit sekunder yaitu flavonoid. Menurut Cheynier, *et al* (2013) bahwa pemberian auksin dan sitokinin pada media tanpa adanya penambahan elisitor dapat memicu kandungan metabolit sekunder karena auksin dan sitokinin bekerja dalam mengatur jalur shikimat atau jalur phenylpropanoid. Penyebab lainnya yaitu pengaturan pada komposisi media tanam yang digunakan adalah strategi penting dalam memproduksi senyawa metabolit sekunder pada kalus dan kultur suspensi sel (Kittipongpatana, *et al*, 1998). Hal ini didukung oleh pendapat Rao and Ravishankar (2002) bahwa produksi metabolit sekunder dapat ditingkatkan dengan stress nutrisi dan elisitasi. Naik turunnya kandungan flavonoid pada kalus karena sifat flavonoid yang tidak stabil karena perubahan kimia, cahaya, dan perubahan pengaruh oksidasi (Kometami, *et al*, 1990).

Perlakuan pada konsentrasi 0,5 mg/l mengandung senyawa flavonoid total sebesar 206, 15 $\mu\text{gQE/g}$, perlakuan pada konsentrasi 1 mg/l mengandung senyawa flavonoid total sebesar 182,59 $\mu\text{gQE/g}$, sedangkan pada konsentrasi 1,5 mg/l

menghasilkan senyawa flavonoid total sebesar 153, 96 $\mu\text{gQE/g}$. Hal tersebut menunjukkan bahwa pada pemberian kitosan dengan konsentrasi rendah dapat memicu senyawa flavonoid. Penambahan kitosan pada media kalus menyebabkan kalus merespon usaha pertahanan diri karena adanya gangguan dari lingkungan tanam sehingga kalus mengakumulasi fitoaleksin yang dapat mengkatalisis reaksi sinamat dengan mengubah fenilalanin menjadi asam sinamat. Asam sinamat dibentuk untuk meningkatkan senyawa flavonoid. Kitosan digunakan sebagai elisitor karena dapat menginduksi enzim fenilalanin ammonia liase (PAL) (Srisornkompon, *et al*, 2014). Enzim PAL (*phenylalanine ammonia-lyase*) memiliki peran sebagai prekursor utama dalam biosintesis lintasan fenilpropanoid dalam peningkatan kandungan total flavonoid (Ekawati, 2018). Flavonoid merupakan kelompok besar dari senyawa fenolik yang dapat ditingkatkan dengan mengatur kondisi lingkungan dengan intensitas cahaya. Cahaya dapat mempengaruhi aktivitas flavonoid karena adanya aktivitas enzim *flavonon-3-hidroksilase* (F3H) (Nirwan, 2007).

Penurunan terjadi pada kalus dengan konsentrasi 2 mg/l mengandung senyawa flavonoid total sebesar 72, 26 $\mu\text{gQE/g}$. Menurut Barz, *et al* (1990) bahwa pemberian elisitor pada media dengan konsentrasi tinggi dapat menurunkan kandungan metabolit sekunder dikarenakan komponen elisitor yang mengenali seluruh reseptor akan mengalami titik jenuh, sehingga penambahan molekul elisitor yang diberikan tidak dapat meningkatkan jumlah produksi metabolit sekunder. Pemberian kitosan pada media juga dapat menurunkan produksi senyawa flavonoid. Hal ini karena kalus mengalami stress biotik yang disebabkan oleh kitosan sehingga sel mengalami kekurangan air. Berkurangnya air mengakibatkan sel menjauhi dinding sel (plasmolisis) dan kalus menjadi mengkerut (Campbell, 2002). Pada kalus peristiwa tersebut mengakibatkan acetyl CoA tidak membentuk fenilalanin ammonia liase (PAL) dengan baik dan kalus menghasilkan glikolisis yang rendah sehingga tidak memenuhi syarat dalam memproduksi senyawa flavonoid (Rijke, 2005). Penurunan kadar flavonoid pada kalus juga dapat disebabkan oleh stress akibat dari terlalu banyak perlukaan pada sel pada saat proses pemotongan. Perlukaan pada kalus akan menghasilkan kalus yang mengalami

oksidasi akibat dari terakumulasinya senyawa fenol. Senyawa fenol yang teroksidasi akan membentuk quinon yang dapat menyebabkan kematian pada sel-sel. Kematian pada sel karena quinon memiliki sifat racun terhadap sel-sel (Hendaryono, *et al*, 2004).

Kalus dengan konsentrasi 2,5 mg/l menghasilkan kadar flavonoid total tertinggi yaitu 230,05 $\mu\text{gQE/g}$. Menurut Hadrami, *et al* (2010) kitosan adalah elisitor biotik yang dapat memberikan respon fitoaleksin. Kitosan berkerja dalam mengaktifkan gen pertahanan dengan meningkatkan respon biosintesis metabolit sekunder melalui dinding sel. Sistem pertahanan diri pada sel tumbuhan ditingkatkan dengan mensintesis berbagai macam zat biokimia di sekitar sel yang terakumulasi fitoaleksin dengan membentuk antibodi di tempat yang terinfeksi. Hal ini juga dijelaskan oleh Vasconsuelo and Boland (2007) bahwa stress biotik pada sel akan menginduksi metabolit sekunder sebagai respon fitoaleksin sehingga terjadi pengendapan di sekitar dinding sel. Elisitor bekerja dalam mengaktifkan gen dalam membentuk enzim, selain itu juga dalam pembentukan biosintesis metabolit sekunder. Respon pertahanan diri menyebabkan jaringan transduksi sinyal yang dimulai dengan pengenalan elisitor terhadap reseptor (Zhang, *et al*, 2006).

Menurut Landi, *et al* (2017) menyatakan kitosan dapat menginduksi ekspresi gen yang terlibat dalam berbagai proses fisiologis seperti sistem kekebalan tanaman, proses fotosintesis dan metabolisme hormon. Fotosintesis yang berkerja secara optimal akan menghasilkan peningkatan kadar klorofil. Semakin hijau kandungan klorofilnya maka akan terjadi reaksi oksidasi dan akan membentuk senyawa flavonoid (Setiawati, 2016). Menurut Tatiya, *et al* (2011) Molekul yang berhubungan dengan senyawa fenolik yaitu klorofil, polisakarida, protein, terpen, dan bahan inorganik lainnya.

Kadar flavonoid pada tumbuhan lain yang digunakan sebagai standar obat atau penting untuk dikonsumsi yaitu pada tanaman kubis, bayam, wortel, kacang polong, jamur, persik, stroberi, jus jeruk, anggur putih dan kopi mengandung < 10 mg/l flavonoid. Pada tanaman lain seperti selada, kacang-kacangan, cabai merah, tomat, anggur, ceri, anggur merah, dan teh mengandung <50 mg/l. Selain itu pada brokoli, kangkung, seledri, cranberry mengandung 50 mg/l. Sedangkan pada buah

apel mengandung flavonoid sebagai quercetin sebesar 184 mg (Bondonno, *et al* , 2012). Menurut Sumanta and Rahaman (2020) bahwa studi epidemiologi yang dilakukan di Amerika Serikat dan Eropa menyarankan dalam mengobati diabetes melitus (DM) dengan menambahkan flavonoid pada makanan. Dalam analisis dosis-respons dari sebuah metaanalisis studi prospektif menyimpulkan bahwa asupan 500 mg/hari flavonoid dapat menurunkan resiko terserang penyakit diabetes melitus dengan penurunan sebesar 5%.

4.3 Hasil Penelitian Perspektif Sains Dan Islam Subkultur Kalus Kesambi (*Schleichera oleosa* (Lour.) Merr)

Makhluk hidup diciptakan oleh Allah SWT di muka bumi ini untuk memahami kehendak Allah yaitu dengan mempelajari ilmu biologi. Allah menciptakan segala sesuatu yang ada di bumi itu dengan tujuan yang baik. Segala sesuatu dikatakan baik apabila dapat mendatangkan manfaat, salah satunya yaitu tanaman. Tanaman yang dapat dimanfaatkan bagian organnya adalah kesambi. Kesambi banyak dikembangkan di masyarakat awam maupun di dunia penelitian karena mengandung berbagai manfaat untuk kesehatan tubuh. Kesambi dimanfaatkan sebagai obat untuk penyakit disentri, kulit, penyakit perut, dan sengatan ular. Selain itu, kesambi juga dimanfaatkan karena mengandung antioksidan seperti flavonoid. Tujuan Allah SWT menciptakan tanaman yang baik telah dijelaskan dalam surah Luqman ayat 10 sebagai berikut.

خَلَقَ السَّمَوَاتِ بِغَيْرِ عَمَدٍ تَرَوْنَهَا ۗ وَالْأَرْضَ فِي الْأَرْضِ رُؤُوسًا أَنْ نَمِيدَ بِكُمْ وَبَثَّ فِيهَا مِنْ كُلِّ دَابَّةٍ ۗ وَأَنْزَلْنَا مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ

Artinya: “Dia menciptakan langit tanpa tiang yang kamu melihatnya dan Dia meletakkan gunung-gunung (di permukaan) bumi supaya bumi itu tidak menggoyangkan kamu; dan memperkembang biakkan padanya segala macam jenis binatang. Dan Kami turunkan air hujan dari langit, lalu Kami tumbuhkan padanya segala macam tumbuh-tumbuhan yang baik”.

Tafsir Ibnu Katsir oleh Al-Sheikh (1994), bahwa Al-Hasan dan Qatadah mengungkapkan bahwa langit tak memiliki tiang. Allah SWT dalam menciptakan langit dan bumi sudah dalam rancangannya dengan menghidupkan bermacam-macam jenis binatang dengan berbagai bentuk yang berbeda dan kebermanfaatnya

masing-masing. Selain itu, Allah SWT menurunkan air hujan dari langit sebagai upaya menumbuhkan tumbuh-tumbuhan yang bervariasi yang dapat memberikan manfaat. Hal ini menunjukkan bahwa tidak ada yang wajib disembah kecuali Allah SWT. Adanya manfaat dari binatang maupun tumbuhan tersebut diciptakan dengan baik tidak lain karena semua atas izin Allah SWT.

Islam telah mengatur kehidupan setiap manusia secara terperinci agar manusia dapat mengatur kehidupannya dengan baik salah satunya berobat apabila merasakan sakit. Hal ini sebagai upaya ikhtiar manusia untuk menjaga tubuh yang telah diberikan oleh Allah SWT. Bentuk usaha manusia dalam menjaga kesehatannya yaitu dengan memanfaatkan tumbuhan kesambi untuk dikembangkan sebagai obat. Kesambi memiliki kandungan sebagai obat karena adanya kandungan metabolit sekunder seperti flavonoid. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian tentang peningkatan kandungan flavonoid pada Kalus Kesambi (*Schleichera oleosa* (Lour.) Merr.) dengan menggunakan kitosan secara *in vitro* sebagai upaya menambah wawasan dan pengetahuan mengenai manfaat dari kesambi. Hal ini dijelaskan dalam Hadits Riwayat Al-Bukhari dan Muslim yaitu dari Abu Hurairah radhiallahu'anh, bahwa Rasulullah SAW bersabda:

مَا أَنْزَلَ اللَّهُ مِنْ دَاءٍ إِلَّا أَنْزَلَ لَهُ شِفَاءً

Artinya: “Tidaklah Allah menurunkan sebuah penyakit melainkan menurunkan pula obatnya”.

Kesambi adalah tumbuhan yang memiliki banyak manfaat dalam berbagai bidang salah satunya dalam bidang kesehatan seperti obat. Pemanfaatan kesambi sebagai obat karena adanya kandungan metabolit sekunder didalamnya seperti flavonoid. Besarnya manfaat yang dimiliki kesambi dalam mengakumulasi senyawa flavonoid dapat dikembangkan melalui kultur *in vitro*. Kandungan metabolit sekunder melalui kultur *in vitro* dapat diproduksi secara massal dan lebih cepat dibandingkan secara konvensional. Hal ini menunjukkan bahwa pentingnya memikirkan ciptaan Allah di alam, dan manusia berkewajiban untuk berfikir tentang alam dan seisinya salah satunya yaitu dengan mempelajari kultur *in vitro*

dan kebermanfaatannya untuk manusia itu sendiri. Hal ini dijelaskan dalam surah Al-Jaatsiyah ayat 13 :

وَسَخَّرَ لَكُمْ مَّا فِي السَّمَاوَاتِ وَمَا فِي الْأَرْضِ جَمِيعًا مِنْهُ ۗ إِنَّ فِي ذَٰلِكَ لَآيَاتٍ لِّقَوْمٍ يَتَفَكَّرُونَ

Artinya: “ Dan Dia telah menundukkan untukmu apa yang di langit dan apa yang di bumi semuanya, (sebagai rahmat) daripada-Nya. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat tanda-tanda (kekuasaan Allah) bagi kaum yang berfikir”.

Ayat di atas dapat diambil maknanya bahwa manusia berkewajiban untuk berfikir tentang alam dan seisinya asalkan mendatangkan manfaat atau nilai guna untuk manusia. Hal ini dijelaskan dalam tafsir jalalayn bahwa (Dan Dia menundukkan untuk kalian apa yang ada di langit) berupa matahari bulan bintang-bintang, air hujan dan lain-lainnya (dan apa yang ada di bumi) berupa binatang-binatang, pohon-pohonan, tumbuh-tumbuhan, sungai-sungai dan lain-lainnya. Maksudnya, Dia menciptakan kesemuanya itu untuk dimanfaatkan oleh kalian (semuanya) lafal “جَمِيعًا” ini berkedudukan menjadi Taukid, atau mengukuhkan makna lafal sebelumnya (dari-Nya) lafal “مِنْهُ” ini menjadi hal atau kata keterangan keadaan, maksudnya semuanya itu ditundukkan oleh-Nya. (Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat tanda-tanda kekuasaan dan keesaan Allah bagi kaum yang berpikir) mengenainya, karena itu lalu mereka beriman.

Dalam penelitian ini peningkatan kandungan flavonoid pada kalus kesambi dengan pemberian kitosan diharapkan dapat memproduksi kadar flavonoid secara optimal. Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, perlakuan kitosan pada konsentrasi 2,5 mg/l menghasilkan rata-rata berat kalus lebih optimal dibandingkan dengan konsentrasi lainnya yaitu sebesar 0,47 gram dan kandungan flavonoid total sebesar 230,05 µgQE/g. Sedangkan warna dan tekstur yang dihasilkan dari kalus dengan konsentrasi 2,5 mg/l yaitu kalus menunjukkan warna hijau dengan tekstur kompak. Hal ini tercantum dalam Surah Al-Qamar ayat 49 yang menerangkan bahwa Allah SWT telah menciptakan segala sesuatu sesuai ukuran atau kadarnya sehingga dapat berkembang secara optimal.

إِنَّا كُلَّ شَيْءٍ خَلَقْنَاهُ بِقَدَرٍ

Artinya: “*Sesungguhnya Kami menciptakan segala sesuatu menurut ukuran*”.

Ayat di atas menerangkan bahwa Allah SWT telah mengatur segala sesuatu yang telah diciptakanNya sesuai kadar ukurannya masing-masing. Sehingga dalam penelitian pemberian kitosan dengan konsentrasi yang bervariasi pada kalus kesambi memberikan hasil yang berbeda-beda. Menurut Muyasar (2007) mengungkapkan bahwa segala sesuatu yang terjadi di bumi maupun langit terjadi berdasarkan takdir Allah SWT.

Manusia diciptakan sebagai khalifah di bumi oleh Allah SWT lengkap dengan akal dan nafsu. Hendaknya manusia menggunakan akalnya dalam hal kebaikan seperti mempelajari ilmu pengetahuan. Allah SWT menciptakan bumi sebagai tempat tinggal makhluk hidup seperti manusia dan manusia sebagai khalifah senantiasa dapat menjaga bumi yang telah diciptakan oleh Allah SWT sedemikian rupa. Upaya manusia dalam menjaga bumi yaitu dengan melestarikan persediaan bumi seperti tumbuhan, dan memanfaatkannya dengan baik agar dapat selalu diperbaharui. Kultur *in vitro* pada kalus kesambi dalam meningkatkan kandungan flavonoid yang dilakukan dalam penelitian ini diharapkan dapat dijadikan alternatif dalam melestarikan hasil bumi. Kultur *in vitro* dimanfaatkan dalam ilmu pengetahuan sebagai upaya perbanyakan maupun memproduksi metabolit sekunder seperti flavonoid, seperti yang telah dijelaskan dalam Surah Ali-Imron ayat 191, yaitu :

الَّذِينَ يَذْكُرُونَ اللَّهَ قِيَمًا وَنُحُودًا وَعَلَىٰ كُنُوفِهِمْ وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ السَّمٰوٰتِ وَالْاَرْضِ رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هٰذَا بَطٰلًا
مُّبْحَلًّا فَقِنَا عَذَابَ النَّارِ

Artinya: “(yaitu) orang-orang yang mengingat Allah sambil berdiri atau duduk atau dalam keadan berbaring dan mereka memikirkan tentang penciptaan langit dan bumi (seraya berkata): “Ya Tuhan kami, tiadalah Engkau menciptakan ini dengan sia-sia, Maha Suci Engkau, maka peliharalah kami dari siksa neraka”.

Menurut Shihab (2001) Telah menjadi ciri Ulu al-Albab bahwa mereka selalu merenungkan penciptaan langit dan bumi, dan keunikan yang terkandung di dalamnya sambil berkata, “Tuhanku, tidak Engkau ciptakan jagat ini tanpa ada

hikmah yang telah Engkau tentukan di balik itu. Engkau tersucikan dari sifat-sifat serba kurang, bahkan ciptaan-Mu itu sendiri adalah bukti kekuasaan dan hikmah-Mu. Hindarkanlah kami dari siksa neraka, dan berilah kami taufik untuk menaati segala perintah-Mu.

Manusia sebagai khalifah di bumi diminta oleh Allah SWT untuk selalu mengingat Allah SWT dan mengingat segala sesuatu yang telah diciptakan olehNya. Peran manusia sebagai khalifah hendaknya selalu berfikir dengan akal sehatnya dalam kondisi apapun. Peran manusia sangat penting dalam menjaga kelestarian bumi yang ditempatinya dan paham dalam segala permasalahan yang ada. Agar manusia dapat mencari solusi agar tidak terjadi kepunahan dan kekayaan alam di bumi dapat terus dinikmati sampai anak cucu kelak. Manusia sebagai khalifah hendaknya memiliki tanggung jawab penuh atas apa yang telah diberikan oleh Allah SWT dengan menjaga dan merawat sumber daya alam yang sudah tersedia yaitu dengan memanfaatkan dan mempelajari tentang peningkatan flavonoid menggunakan kalus kesambi dengan penambahan kitosan secara *in vitro*.

BAB V PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dengan judul “Peningkatan Kandungan Flavonoid pada Kalus Kesambi (*Schleichera oleosa* (Lour.) Merr) dengan Menggunakan Kitosan secara *In Vitro*, maka kesimpulan yang dapat diambil adalah:

1. Pemberian konsentrasi kitosan terhadap kualitas dan kuantitas subkultur kalus kesambi menunjukkan adanya pengaruh pada setiap konsentrasinya. Namun, pada konsentrasi 2,5 mg/l memberikan hasil yang lebih optimal. Kualitas kalus diamati secara visual yaitu warna dan tekstur kalus. Warna kalus pada konsentrasi 2,5 mg/l menghasilkan kalus yang berwarna hijau. Tekstur kalus pada semua konsentrasi menunjukkan hasil yang sama yaitu bertekstur kompak. Kuantitas kalus diukur melalui berat kalus. Berat kalus pada konsentrasi 2,5 mg/l menghasilkan rata-rata berat kalus terbaik dibandingkan konsentrasi kitosan lainnya. Rata-rata berat kalus yang dihasilkan sebesar 0,47 gram.
2. Pemberian konsentrasi kitosan terhadap kadar flavonoid total pada kalus kesambi menunjukkan hasil yang berbeda. Namun, pada konsentrasi 2,5 mg/l memberikan hasil yang lebih optimal sebesar 230,05 $\mu\text{gQE/g}$ dibandingkan dengan konsentrasi kitosan lainnya.

5.2 Saran

1. Penelitian ini perlu dilakukan uji lanjut mengenai kandungan flavonoid kalus kesambi (*Schleichera oleosa* (Lour.) Merr) dengan menggunakan metode uji yang berbeda yaitu LCMS (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*) atau GCMS (*Gas Chromatography-Mass Spectrometry*).
2. Penelitian mengenai pemberian konsentrasi kitosan dapat dilakukan lebih lanjut dengan konsentrasi yang lebih tinggi.
3. Kalus tidak harus lebih tinggi dibandingkan daun, kecuali kadar klorofilnya disamakan.

4. Penambahan kitosan pada media bukan hanya sebagai elisitor. Namun, dimasukkan sebagai media wajib untuk kalus yang optimum pertumbuhannya.



DAFTAR PUSTAKA

- Abbade, L. C, Paiva, P. D. D. O, Paiva, R, Gracino, M. H. P. Growth Curve and Biochemical Analyses of Callus of IPE-BRANCO (*Tabebuia roseo alba* (Ridl.) Sand.). *Naturalia*.
- Abidin, Z. 1982. *Dasar-Dasar Pengetahuan Tentang Zat Pengatur Tumbuh*. Bandung: Angkasa.
- Abidin, Z. 1990. *Dasar-Dasar Pengetahuan Tentang Zat Pengatur Tumbuh*. Bandung: Angkasa.
- Abiri, R, Maziah, M, Shaharuddin, N. A, Yusof, Z. N. B, Atabaki, N, Hanafi, M. M, Sahebi, M, Azizi, P, Kalhori, N, and Valdiani, A. 2017. Enhancing Somatic Embryogenesis of Malaysian Rice Cultivar MR219 using Adjuvant Materials in a High-Efficiency Protocol. *Int. J. Environ. Sci. Technol.*
- Aboshama, H. M, El-Sayed, G. A, Al-Dremly, N. I. 2018. Somatic Embryogenesis Induction of Litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) from Leaves of Mature Trees. *Journal of Scientific and Innovative Research*. 7(3).
- Achmad, S. A. 1986. *Kimia Organik Bahan Alam. Materi A Ilmu kimia. Flavonoid*. Jakarta: Karunia Universitas Terbuka.
- Adri, R. F. 2012. Pengaruh 2,4-D Terhadap Pembentukan Embrio Somatik Tanaman Gambir (*Uncaria gambir*) dan Uji Responnya Terhadap PEG Dalam Upaa Memperoleh Klon Gambir Toleran Cekaman Kekeringan. Tesis. Universitas Andalas.
- Al-Qarni, A. 2007. *Tafsir Muyassar*. Jakarta: Qisthi Press.
- Andaryani, S. 2010. Kajian Penggunaan Berbagai Konsentrasi BAP dan 2,4-D Terhadap Induksi Kalus Jarak Pagar (*Jatropha Curcas* L) secara *In Vitro*. Skripsi. Faperta Universitas Sebelas Maret. Surakarta.
- Arab, E. A. A and Ferial, M. A. S. 2010. Evaluation of Bioactive Compounds of *Stevia rebaudiana* Leaves and Callus. *African Journal of Food Science*. 4 (10).
- Ariani, E, Wicaksono, F. , Irwan, A. W, Nurmala, T, Yuwariah, Y. 2015. Pengaruh Berbagai Pengaturan Jarak Tanam dan Konsentrasi Giberelin (GA₃) Terhadap Pertumbuhan dan Hasil Tanaman Gandum (*Triticum aestivum* L) Kultivar Dewata di Dataran Medium Jatiningor. *Agric. Sci. J.* 2(1).

- Ariani, R, Anggraito, Y. U, and Rahayu, E. S. 2016. Respon Pembentukan Kalus Koro Benguk (*Mucuna Pruriens* L.) pada Berbagai Konsentrasi 2,4-D dan BAP. *Jurnal MIPA*. 39(1).
- Ariati. S. N. 2012. Induksi Kalus Tanaman Kakao (*Theobroma cacao* L) pada Media MS dengan Penambahan 2,4-D, BAP, Air Kelapa. *Jurnal Natural Science*. 1(1).
- Arifin, B, dan Ibrahim, S. 2018. Struktur Bioaktivitas dan Antioksidan Flavonoid. *Jurnal Zarah*. 6(1).
- Arifuddin, M. 2013. Sitotoksitas Bahan Aktif Lamun dari Kepulauan Spermonde Kota Makassar Terhadap *Artemia Salina*. *Jurnal Ilmu Kelautan Universitas Hasanuddin Makassar*.
- Atmadja, F. 2014. Pengaruh Kitosan Kulit Pupa Ulat Sutera Sebagai Pengganti Formalin Terhadap Daya Simpan Tahu. Skripsi. Fakultas Ekologi Manusia, Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Badawy, M. E. I, and E. I Rabea. 2011. A Biopolymer Chitosan and its Derivatives as Promising Antimicrobial Agents Against Plant Pathogens and Their Applications in Crop Protection. *Int J. Carb. Chem*.
- Bahri, S. 2010. *Klorofil*. Diktat Kuliah Kapita Selekta Kimia Organik. Universitas Lampung.
- Balandrin, M, F, and J. A. Klocke. 1988. *Medicine, Aromatic and Industrial Materials from Plants, Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Berlin: Springer.
- Baque, M. A, Shiragi, M. H. K, Lee, E. J, Paek, K. Y. 2012. Elicitor Effect of Chitosan and Pectin on the Biosynthesis of Anthraquinones, Phenolics, and Flavonoids in Adventitious Root Suspension Cultures of *Morinda citrifolia* (L.). *AJCS*. 6(9).
- Barz, W, Bless, W, Borger-Papendorf, G, Gunia, W, Makenborck, U, Meier, D, Otto, C. H, and Super, E. 1990. Phytoalexin as the Part of Induced defense Reaction in Plant: Their elicitation, Function, and Metabolism, In: Bioactive Compound of Plants (Ciba Foundation Symposium 154). Wiley. Hichester.
- Beg, S, Swain, S, Hasain, H, Barkat, M.A, and Hussain, M. S. 2011. Systematic Review of Herbals as Potential Anti-Inflammatory Agents: Recent Advances, Current Clinical Status and Future Perspectives. *Pharmacogn Rev*. 2(10).

- Bekti, R, Solichatun, E, and Anggarwulan. 2003. Pengaruh Asam 2,4-Diklorofenoksiasetat (2,4-D) terhadap Pembentukan dan Pertumbuhan Kalus Serta Kandungan Flavonoid Kultur Kalus *Acalypha indica* L. *Biofarmasi*. 1(1).
- Bhojwani, S. S and M. K, Razdan. 1996. *Plant Tisssue Culture: Theory and Practice, a Revised Edition*. Amsetrdam: Elsevier Science B. V.
- Bondonno, C. P, Yang, X, and Croft, K. D. 2012. Flavonoid-Rich Apples and Nitrate Rich Spinach Augmnt Nitric Oxide Status and Improve Endothelial Function in Healthy Men and Women a Randomized Controlled Trial. *Free Radical Biology and Medicine*. 52(1).
- Boonlertnirun, S, Boonraung, C, and Suvanasara, R. 2008. Application of Chitosan in Rice Production. *Journal of Metals, Materials, and Mineral*.
- Campbell, N. A, Reece, J. B, dan Mitchell, L. G. 2002. *Biologi Jilid 1. Edisi Ke Lima*. Jakarta: Erlangga.
- Cangahuala-Inocente, G. C, Steiner, N, Santos, M, Guerra, M. P. 2004. Morphohistological Analysis and Histochemistry of *Feijoa Sellowiana* Somatic Embryogenesis. *Protoplasma*.
- Chandrkrachang, S. 2002. The Applications of Chitin and Chitosan in Agriculture in Thailand *In: K. Suchiva, Chundrakrachang, P, Methacanon, M. G, Peter* (Eds). *Advences in Chitin Science*.
- Cheyrier, V, Comte, G, Davies, K. M, Lattanzio, V, and Martens, S. 2013. Plant Phenolics: Recent Advances on Their Biosynthesis, Genetics, and Ecophysiology. *Plant Physiol*.
- Chorabik, K, N, and Pietrzykowski, M. 2019. Ecophysiological Aspects of *In Vitro* Biotechnological Studies Using Somatic Embryogenesis of Callus Tissue Toward Protecting Forest Ecosystems. *J. For.Res.* 30(4).
- Collin, H. A and Edward, S. 1998. *Plant Cell Culture*. UK: BIOS Scientific Publisher.
- Dahlan, M. S. 2010. *Besar Sampel dalam Penelitian Kedokteran dan Kesehatan*. Jakarta: Salemba Medika.
- Darmono.1995. *Logam Dalam Sistem Biologi Makhluk Hidup*. Bogor: Universitas Indonesia.

- Darwati, I. 2007. Kultur Kalus Akar Rambut Purwoceng (*Pimpinella pruatjan Molk*) Untuk Metabolit Sekunder. Skripsi. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Dasilva, C. 2016. Uji Aktivitas Antibakteri Salep Ekstrak Etanol Biji Kesambi (*Schleichera oleosa* (Lour.) Merr Merr.) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 Secara *In Vivo*. Skripsi. Universitas Setia Budi. Surakarta.
- Devendra, C, Thomas, D, Jabbar, M. A, dan Zerbini, E. *Improvement of Livestock Production in Crop Animal Systems in Agro-Ecological Zones of South Asia*. Nairobi, Kenya: International Livestock Research Institute.
- Dias, M.I, Sousa, M. J, R. C, Alves and Ferreira, I. C. F. R. 2016. Exploring Plant Tissue Culture to Improve The Production of Phenolic Compounds: A Review. *Industrial Crops and Prod.*
- Docimo, T, Davis, A. J, Luck, K, Fellenberg, C, Reichelt, M, Philips, M, Gershenzon, J, and Auria, J. C. D. 2015. Influence of Medium and Elicitors on The Production of Cocaine, Amino Acids and Phytohormones by *Erythroxylum coca calli*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 120 (3).
- Eilert, U, Constabel, F, and Kurz, W.G.W. 1986. Elicitor Stimulation of Monoterpene Indole Alkaloids Formation in Suspension Culture of *Catharanthus roseus*. *Journal of Plant Physiology*.
- Ekawati, R. 2018. Produksi Pucuk dan Kandungan Flavonoid Tanaman Kolesom pada Cekaman Naungan. *J. Hort, Indonesia.* 9(3).
- Ernawati, A. 1992. *Produksi Senyawa-Senyawa Metabolit Sekunder dengan Kultur Jaringan Tanaman I*. Bogor: PAU Bioteknologi IPB.
- Fan, X, X, Zang, J, Xu, Z. G, Guo, S, Jiao, X. L, Liu, X. , and Gao, Y. 2013. Effects of Different Light Quality on Growth, Chlorophyll Concentration and Chlorophyll Biosynthesis Precursors of Non-Heading Chinese Cabbage (*Brassica campestris* L.). *Acta. Physiol Plant.*
- Fatmawati, A. 2008. Kajian Konsentrasi BAP dan 2,4-D Terhadap Induksi Kalus Tanaman *Artemisia annua* L, Secara *In Vitro*. Skripsi. Fakultas Pertanian UNS. Surakarta.
- Gaspar, T, Kevers, C, Penel, C, Greppin, H, Reid, D. M, and Thorpe, T. A. 1996. Plant Hormones and Plant Growth Regulator in Plant Tissue Culture *In Vitro* *Cell Dev. Biol-Plant.* 32(1).

- George, E. F, and P. D, Sherrington. 1994. *Plant Propagation by Tissue Culture*. England: Exegetics Limited.
- Goswami, S and Singh, R. P. 2017. Ayurvedic, Phytochemical and Pharmacological Review of *Schleichera oleosa* (Lour.) Merr (Lour.) Oken: A Traditional Plant with Enormous Biological Activity. *World Journal of Pharmaceutical Research*. 6(10).
- Guleria, H and Vaidya M. 2015. Anatomical Studies of *Schleichera oleosa* (Lour.) Merr (Lour) Oken. *World Journal of Pharmaceutical Research*. 4(12).
- Guyton, A. C. 1994. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran Edisi 7 Bagian III*. Jakarta: Kedokteran EGC.
- Hadrami, A. E, Adam, L. R, Hadrami, I, E, and Daayf, F. 2010. Chitosan in Plant Protection. *Mar. Drugs*.
- Hadwiger, L. A. 2013. Multiple Effects of Chitosan on Plant Systems: Solid Science or Hype. *Plant Sci*.
- Hahlbrock, K. 1981. *Flavonoids. dalam The Biochemistry of Plants, Vol.7: Secondary Plant Products*. New York: Academic Press.
- Hahlbrock. K dan Griscbach, H. 1975. *Dalam The Flavonoid* (J.B. Harborne, T. J. Mabry dan H. Marbry, pny.) London: Chapman and Hall
- Harahap, R. A. 2005. Studi Kultur Kalus Tanaman Pegagan (*Centela asiatica* L.) untuk Menghasilkan Senyawa Asiatikosida. Tesis. Institut Pertanian Bogor.
- Harborne, J.B. 1987. *Metode Fitokimia Edisi Ke Dua*. Bandung: ITB.
- Harborne, J.B. 1994. *The Flavonoids*. London: Chapman dan Hall.
- Harmita. 2004. Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. 1(3).
- Hendaryono, D. P. S dan A. Wijayani. 1994. *Teknik Kultur Jaringan, Pengenalan dan Petunjuk Perbanyakkan Tanaman Secara Vegetatif*. Yogyakarta: Kanisius.
- Herbert, R. B. 1995. *The Biosynthesis of Secondary Metabolites*. Terjemahan Srigandono B. IKIP Semarang Press.

- Heyne, K. 1987. *Tumbuhan Berguna Indonesia Jilid II*. Diterjemahkan oleh Badan Litbang Kehutanan. Jakarta: Yayasan Sarana Wana Jaya.
- Hutami, S. 2008. Masalah Pencoklatan pada Kultur Jaringan. *Jurnal Agrobien*. 4(2).
- Ibaraki, Y, and Kurata, K. 2001. Automation of Somatic Embryo Production. *Plant Cell Tiss Org Cult*.
- Ilyas, Asriany. 2013. *Kimia Organik Bahan Alam*. Makassar: Alauddin University Press.
- Indah, P. N, dan Ermavitalini, D. 2013. Induksi Kalus Daun Nyamplung (*Calophyllum inophyllum Liin*) pada Beberapa Kombinasi Konsentrasi 6-Benzylaminopurin (BAP) dan 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D). *Jurnal Sains dan Seni Pomits*. 2(1).
- Jannat, M, Hossain, M. K, and Kamruzzaman, M. 2016. Vegetative Propagation Potential of Kusum (*Schleichera oleosa (Lour.) Merr Lour*) by Stem Cutting from Young Stock Plants. *Imperial Journal of Interdisciplinary Research*. 2(10).
- Jose, S, Dandapat, S, Sinha, M. P. 2019. Anti-hypertensive activity of Aqueous and Methanolic Leaf Extracts of *Schleichera oleosa (Lour.) Merr (Lour.) Merr*. *Journal of Analytical & Pharmaceutical Research*. 8(3).
- Kaimudin, M, and Maria, F. L. 2016. Karakterisasi Kitosan dari Limbah Udang dengan Proses *Bleaching* dan Deasetilasi yang Berbeda. *Majalah BIAM*. 12(01).
- Kalogirou, S. 2009. *Solar Energy Engineering: Processes and Systems*, Elsevier's Science & Technology.
- Kartika, L, Atmojoyo, P.K, and Purwijantiningsih, L. M. E. 2014. Kecepatan Induksi Kalus dan Kandungan Eugenol Sirih Merah (*Piper crocatum ruiz and pav.*) yang Diperlakukan Menggunakan Variasi Jenis dan Konsentrasi Auksin (makalah). Universitas Atma Jaya. Yogyakarta.
- Katiyar, D, Hermantaranjan, A, and Singh, B. 2015. Chitosan as Promising Natural Compound to Enhance Potential Physiological Responses in Plant: a Review. *Indian J. Plant*.
- Katuuk, Jeanette. 1989. *Teknik Kultur Jaringan dalam Mikropropagasi Tanaman*. Jakarta: Departemen Pendidikan dan Kebudayaan

- Khan, T. A, K. K, Peh, and S. C. Hung. 2002. Reporting Degree of Deacetylation Value of Chitosan: the Influence of Analytical Methods. *J. Pharm Pharmaceut Sci.* 5(3).
- Khan, M. J, Saraf, S, and Saraf, S. 2017. Anti-Inflammatory and Associated Analgesic Activities of HPLC Standardized Alcoholic Extract of Known Ayurvedic Plant *Schleichera oleosa* (Lour.) Merr. *Journal of Ethnopharmacology.*
- Khandekar, U, Bobade, A, and Ghongade, R. 2015. Evaluation of Antioxidant Activity In-vitro Antimicrobial Activity and Phytoconstituents of *Schleichera oleosa* (Lour.) Merr (Lour) Oken. *Int J Biol Pharm Res.*
- Kim, H. J, Chen, F, Wang, X, and Rajapakse, N. C. 2005. Effect Chitosan on Biological Properties of Sweet Basil (*Ocimum basilicum*). *J. Agric Food Chem.*
- Kittipongpatana, N, Hock, R. S, and Porter, J. R. 1998. Production of Solasodine by Hairy Root, Callus and Cell Suspension Culture of *Solanum aviculare*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*
- Kometami, T. Y, Terada, T, Nishimura, T, Nakae, H, Takii and Okada. 1996. Acceptor Specificity of Cyclodextrin Glucanotransfrase from an Alkalophilic *Bacillus* Species and Synthesis of Glycosyl rhamnose. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry.* 60(7).
- Kusumawati, N, 2009. Pemanfaatan Limbah Kulit Udang Sebagai Bahan Baku Pembuatan Membran Ultrafiltrasi. *Inotek.*13(2).
- Lakitan, B. 1996. *Fisiologi Pertumbuhan dan Perkembangan Tanaman.* Jakarta: Raja Grafindo Persada.
- Landi, L, De Miccolis Angelini, R. M, Pollastro, S, Feliziani, E, Faretra, F, and Romanazzi, G. 2017. Global Transcriptome Analysis and Identification of Differentially Expressed Genes in Strawberry After Preharvest Application of Benzothiadiazole and Chitosan. *Frontiers in Plant Science.*
- Lawendatu, O. P. G, Pontoh, J, and Kamu, V. S. 2019. Analisis Kandungan Klorofil pada Berbagai Posisi Daun dan Anak Daun Aren (*Arrenga pinnata*). *Chem. Prog.* 12(2).
- Lee, S, Chen, X. G, Park, H. J, Liu, C. G, Liu, C. S, Meng, X. H, and Yu, L. J. 2006 Effect of MW and Concentration of Kitosan on Antibacterial Activity of *Escherichia Coli*, *Carbohydr. Polym.*

- Li, Z, Zhang, Y, Zhang, X, Merewitz, E, Peng, Y, Ma, X, Huang, L, and Yan, Y. 2017. Metabolic Pathways Regulated by Chitosan Contributing to Drought Resistance in White Clover. *Journal of Proteome Research*.
- Mahadi, I, W, Syafi'i, Y, Sari. 2016. Induksi Kalus Jeruk Katsuri (*Citrus microcarpa*) menggunakan Hormon 2,4-D dan BAP dengan Metode *In Vitro*. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*. 21(2).
- Mahatmanti, F. D dan Sumarni, W. 2003. Kajian Termodinamika Penyerapan Zat Warna Metil Oranye (MO) dalam Larutan Air Oleh Kitosan. *JKSA*. 6(2).
- Malerba, M, and Cerana, R. 2016. Chitosan Effects on Plant Systems. *Int. J. Mol.*
- Mawgoud, A. M. 2003. Growth and Yield Responses of Strawberry Plants to Chitosan Application. *European J. Of Scientific Res*. 39(1).
- Moko, H, E. M, Rahmat, S. M. D, dan Rosita. 1993. Respon Meniran terhadap Penggunaan Zat Pengatur Tumbuh. *Warta Tumbuhan Obat Indonesia*. 2(4).
- Mostafiz, S. B, and Wagiran, A. 2018. Efficient Callus Induction and Regeneration in Selected *Indica* Rice. *Agronomy*.
- Moye, Z. D, Burne, R. A, and Zeng, L. 2014. Uptake and Metabolism of n-acetylglucosamine and glucosamine by *Streptococcus mutans*. *Appl Environ Microbiol*. 80(16).
- Mukhriani. 2014. *Farmakognosi Analisis*. Makassar: Alauddin University Press.
- Mursyidi, A. 1990. *Analisis Metabolit Sekunder*. Yogyakarta: UGM Press.
- Neldawati, R, and Gusnedi. 2013. Analisis Nilai Absorbansi dalam Penentuan Kadar Flavonoid untuk Berbagai Jenis Daun Tanaman Obat. *Pillar of Physics*. Vol. 2.
- Nirwan. 2007. Produksi Flavonoid Daun Dewa (*Gynura pseudochina* L (DC)). Asal Kultur *In Vitro* pada Kondisi Naungan dan Pemupukan. Disertasi. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Pandiangan, D, Esyanti, R.R, dan Astuti, D.P. 2009. Pola Pertumbuhan Dan Produksi Katarantin Kultur Agregat Sel *C. Roseus* yang diberi Perlakuan Triptofan. Prosiding Seminar Nasional Biologi di Bandung.
- Parwata, I. M. O. A. 2016. *Flavonoid*. Denpasar: Univeristas Udayana.

- Peer, W. A, Brown, D. E, Muday, G. K, Taiz, L, and Murphy, A. S. 2001. Flavonoid Accumulation Patterns of Transparent Testa Mutants of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*
- Peri, P. L, G. Martines Pastur, M. V, Lencinas. 2009. Photosynthetic Response to Different Light Intensities and Water Status of Two Main *Nothofagus* Species of Southern Patagonian Forest, Argentina. *Journal of Forest Science.* 55 (3).
- Pierik, R. L. M. 1987. *In Vitro Culture of Higher Plant*. Netherland: Martinus Nijhof Publisher.
- Plants USDA. 2019. *Plants Profile for Schleicheria oleosa* (Lour.) Merr (*lac tree*). (Online), (<http://plants.usda.gov/core/profile?symbol=SCOL3>, diakses 19 Desember 2019).
- Pokhrel, I, Sharma, B, and Bajracharya, G. B. 2015. Brine Shrimp Lethality and Antibacterial Activit of Extracts from Bark of *Schleicheria oleosa* (Lour.) Merr. *Journal of Coastal Life Medicine.*
- Pratiwi, R. 2014. Manfaat Kitin dan Kitosan Bagi Kehidupan Manusia. *Oseana.* 39(1).
- Puchoa, D. 2004. In Vitro Regeneration of Lychee (*Litchi chinensis* Sonn). *African Hournal of Biotechnology.* 3(11).
- Purnamaningsih, R, and Misky, A. 2011. Pengaruh BAP dan NAA Terhadap Induksi Kalus dan Kandungan Artemisin dari *Artemisia annua* L. *Berita Biologi.* 10(4).
- Purwanto, P. A dan Mardin, S. 2007. Modifikasi Media MS dan Perlakuan Penambahan Air Kelapa untuk Menumbuhkan Eksplan Tanaman Kentang. *Jurnal Penelitian dan Informasi Pertanian "Agrin".* 11 (1).
- Purwianingsih, W, Hidayat, R. Y, and Rahmat, A. 2019. Increasing Anthraquinone Compounds on Callus Leaf *Morinda citrifolia* (L.) by Elicitation Method Using Chitosan Shell of Shrimps (*Penaeus monodon*). *Journal of Physics Conference Series.*
- Raharjo, T. J. 2013. *Kimia Hasil Alam*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Rahayu, B. S dan Anggarwulan, E. 2003. Pengaruh Asam 2,4-Diklorofenosiasetat (2,4-D) Terhadap Pembentukan dan Pertumbuhan Kalus Serta Kandungan Flavonoid Kultur Kalus *Acalypha indica*, L. *Biofarm.* 1(1).

- Rahman, N. N. N. A, Zarina, Z, and Kadir, M. O. A. 2003. Influence of Elicitor Availability on Limonene and Linalool Accumulation from *Citrus grandis* Cell Cultures. *Malaysian Journal of Pharmaceutical Sciences*. Vol.1.
- Rahmawati, K. G. 1999. *Secondary Plant Product in Nature' in Biotechnology Secondary Metabolism*. U. S. A: Science Publisher, inc.
- Rao, S. R and Ravishankar, G. A. 2002. Plant Cell Culture: Chemical Factories of Secondary Metabolites. *Biotechnol. Adv.*
- Rashid, U, Ali, S, Ali, G. M, Ayub, N, and Masood, M. S. 2009. Establishment of an Efficient Callus Induction and Plant Regeneration System in Pakistan Wheat (*Triticum awstivum*) Cultivars. *Journal of Biotechnology*.
- Redha, A. 2010. Flavonoid: Struktur, Sifat Antioksidatif dan Peranannya Dalam Sistem Biologis. *Jurnal Bellan*. 9(2).
- Resmianty, Teti. 2012. Efektifitas Kitosan dan Biofilter Eceng Gondok (*Eichornia crassipes (Mart) Solm*) dan Kijing Taiwan (*Anodonta woodiana*) Sebagai Adsorben Pada Pengolahan Limbah yang Mengandung Logam Hg, Cd, dan Pb. Thesis. IPB.
- Rijke, E. 2005. Trace-Level Determination of Flavonoids and Their Conjugates. *Journal Farmasi*. 2(1).
- Robinson, T. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*, Edisi VI, diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata. Bandung: ITB Press.
- Ruswaningsih, F. 2007. Pengaruh Konsentrasi *Amonium Nitrat* dan BAP Terhadap Pertumbuhan Eksplan Pucuk *Artemisia annua*, L pada Kultur *In Vitro*. Skripsi Fakultas Pertanian UNS. Surakarta.
- Sa'diyah, U. 2019. Peningkatan Kandungan Flavonoid Kalus Delima Hitam (*Punica granatum* L) dengan Penambahan *Polyethylene Glycol* (PEG) 6000 Melalui Teknik *In Vitro*. Skripsi. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Salisbury, F. B, dan Ross, C. W. 1995. *Fisiologi Tumbuhan Jilid 2*. Bandung: ITB.
- Sangeetha, G, Nikhila, g. S, and Swapna, T. S. 2016. An Efficient Plant Regeneration and *in vitro* Secondary Metabolite Production in *Pseudarthria viscida* (L.) Wight and Arn. *International Journal of Current Research*. 8(6).
- Sanjaya, I. & Yuanita. 2007. Adsorpsi Pb (II) oleh Kitosan Hasil Isolasi Kitin Cangkang Kepiting Bakau (*Scylla* sp.). *Jurnal Ilmu Dasar*. 8(1).

- Santha, M. L, Kanchana, P, and Supriya, C. H. 2015. Anti Nociceptive and Anti Inflammatory Activity of *Shleichera oleosa* (lour) Oken Bark. *Am. J. Pharm Tech Res.* 5(3).
- Santoso, U dan Nursandi, F. 2003. *Kultur Jaringan Tanaman*. Malang: Universitas Muhammadiyah Malang.
- Sari, Y. P, Kusumawati, E, Saleh, C, Kustiawan, W, and Sukartiningsih. 2018. Effect of Sucrose and Plant Growth Regulators on Callogenesis and Preliminary Secondary Metabolic of Different Explant *Myrmecodia tuberosa*. *Nusantara Bioscience.* 10(3).
- Sekhar, S. C, Karuppasamy, K, Vedaraman, N, and Kabeel, A. E. 2018. Biodiesel Production Process Optimization from *Pithecellobium dulce* seed oil: Performance, Combustion, and Emission Analysis on Compression Ignition Engine Fuelled with Diesel/Biodiesel Blends. *Energy Conversion and Management.*
- Setiawati, T, Saragih, I. A, Nurzaman, M, and Mutaqin, A. Z. 2016. Analisis Kadar Klorofil dan Luas Daun Lampeni (*Ardisai humilis* Thunbergh) Pada Tingkat Perkembangan yang Berbeda di Cagar Alam Pangandaran. Prosiding Seminar MIPA Peran Penelitian Ilmu Dasar dalam Menunjang Pembangunan Berkelanjutan. Universitas Padjajaran: Jatinangor.
- Shihab, Q. 2001. *Membumikan Al-Qur'an, Fungsi dan Peran Wahyu dalam Kehidupan Manusia*. Bandung: Mizan.
- Shihab, Q. 2002. *Tafsir Al-Mishbah: Pesan, Kesan, dan Keserasian Al-Qur'an*. Jakarta: Lentera Hati.
- Sholihah, A. 2011. *Produk Metabolisme Tumbuhan*. Makalah Keguruan dan Pendidikan. Universitas Ahmad Dahlan.
- Shukla, S and Mehta, A. 2015. Anticancer Potential of Medicinal Plants and Their Phytochemicals a Review. *Rev Bras Bot.* 38(2).
- Simanjuntak, K. 2012. Peran Antioksidan Flavonoid Dalam Meningkatkan Kesehatan. *Bina Widya.* 23(3).
- Sitinjak, M, A, Isda, m. N, and Fatonah, S. 2015. Induksi Kalus dari Eksplan Daun *In Vitro* Keladi Tikus (*Typhonium* sp.) dengan Perlakuan 2,4-D dan Kinetin. *Al-Kaunyah Jurnal Biologi.* 8(1).

- Sitinjak, R. R, Rostiana, Karyono, dan T Supriatun. Pengaruh 2,4-D dan BA Terhadap Induksi Kalus Embriogenik Pada Kultur Meristem Jahe (*Zingiber officinale* Rosc.). 8(2).
- Soelaman, S, and Donor, R. 2013. *Halaman Organik: Mengubah Taman Rumah menjadi Tanaman Sayuran Organik untuk Gaya Hidup Sehat*. Jakarta Selatan: PT. Agro Media Pustaka.
- Srinivas, T. L, Lakshmi, S. M, Sharma, S. N, Reddy, G. K, Prasanna, K. 2013. Medicinal Plants as Anti-Ulcer Agents. *J Pharmacogn Phytochem*. 2(4).
- Srisornkompon, P, Pichyangkura, R, dan Chadchawan, S. 2014. Chitosan Increased Phenolic Compound Content in Tea (*Camellia sinensis*) Leaves by Pr- and Post- Treatment. *Journal of Chitin and Chitosan Science*. 2(2).
- Sriyanti, D. P, dan Wijayani, A. 1994. *Teknik Kultur Jaringan*. Yogyakarta: Kanisius.
- Street, H. E, and Smith, S. M. 1974. The Decline of Embryogenic Potential as Callus and Suspension Cultures of Carrot (*Daucus carota* L.) are serially Subcultured. *Ann Bot*.
- Sudibyo, R. S. 2002. *Metabolit Sekunder : Manfaat dan Perkembangan dalam Dunia Farmasi*. Pidato Pengukuhan Jabatan Guru Besar pada Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada.
- Sugiyono. 1993. Pengaruh Hormon 2.4-D dan BAP terhadap Multiplikasi Kalus Purwoceng (*Pimpinella pruatjan* Molkenb) pada Kultur Aseptis. Skripsi. Tidak Dipublikasikan. Departemen Pendidikan Nasional Fakultas Biologi Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto.
- Suita, E. 2012. *Seri Teknologi Pembenihan Tanaman Hutan Kesambi* (*Schleichera oleosa* (Lour.) Merr Merr.). Bogor: Balai Penelitian Teknologi Pembenihan Tanaman Hutan.
- Sukmadjaja, D., dan A. Mulyana. 2011. Regenerasi dan Pertumbuhan Beberapa Varietas Tebu (*Saccharum officinarum* L.) secara *In Vitro*. *Jurnal AgroBiogen*. 7(2)
- Suamnta, M, and Rahaman, S. T. 2020. Flavonoids: A vital Resource in Healthcare and Medicine. *Pharmacy and Pharmacology International Journal*. 8(2).
- Suseno, H. 1974. *Fisiologi Tumbuhan: Metabolisme Dasar*: IPB.

- Sutardi. 2008. Kajian Waktu Panen dan Pemupukan Fosfor Terhadap Pertumbuhan dan Produksi Asiatikosida Tanaman Pegagan (*Centella asiatica* L. Urban) di Dataran Tinggi. Thesis. Institut Pertanian Bogor.
- Syahid, F. S, Natalini, N. K, dan Deliah, S. 2010. Pengaruh Komposisi Media Terhadap Pertumbuhan Kalus dan Kadar Tannin dari Daun Jati Belanda (*Guazama ulmifolia* Lamk) secara *In Vitro*. *Jurnal Litri*. 16(1).
- Syanqithi, S. 2007. *Tafsir Adhwa'ul Bayan*. Penerjemah: Fakhurrazi. Jakarta: Pustaka Azzam.
- Taiz, L, and Zeiger, E. 2002. *Plant Physiology, 3rd Ed*. Sinauer Associates Sunderland.
- Taiz, L, and Zeiger, E.2010. *Plant Physiology 5th Edition: Physiological and Ecological Considerations*, Chapter 9. Sinauer Associates Inc, Publisher Sunderland, Massachusetts, USA.
- Tatiya, A. U, Tapadiya, G. G, Kotecha, S, and Surana, S. J. 2011. Effect of Solvents on Total Phenolics, Antioxidant and Antimicrobial Properties of *Bridelia retusa* Spreng. Stem Bark. *Indian Journal of Natural Products and Resources*. 2(4).
- Taufan, M. R, dan Zulfahmi. 2010. Pemanfaatan Limbah Kulit Udang Sebagai Bahan Anti Rayap (*Bio-termitisida*) pada Bangunan Berbahan Kayu. Skripsi. Universitas Diponegoro, Semarang.
- Thorpe, N. O. 1984. *Cell Biology*. John Wiley and Sons. New York.
- Triharyanto, A. 2005. Multiplikasi Tunas Tanaman Gaharu (*Aquilaria malaccensis* lamk) Secara *In Vitro*. Skripsi Mahasiswa Fakultas Kehutanan, Institut Pertanian Bogor
- Trimulyadi, G. R. 2007. *The Development and Field Test of Radiation Degraded Chitosan as Plant Growth Promoter*. Jakarta: National Nuclear Energy Agency.
- Uthairatanakij, A, Silva, J. A. T. D, and Obsuwan, K. 2007. Chitosan for Improving Orchid Production and Quality. *Orchid Science and Biotechnology*. 1(1).
- Vasconsuelo A and Boland R. 2007. Molecularaspects Of The Early Stages Of Elicitation Ofsecondary Metabolites In Plants. Science Direct. *Plant Science*.
- Verma, P, Sharma, M. P, and Dwivedi, G.2016. Impact of Alcohol on Biodiesel Production and Properties. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*.

- Vickery, M. L, and Brian, V. 1981. *Secondary Plant Metabolism*. London: The Macmillan Press.
- Wattimena, G. A. 1991. *Zat Pengatur Tumbuh Tanaman*. Bogor: PAU-IPB.
- Wattimena, G. A. L, Gunawan, N. A, Mattjik, E, Syamsudin, N. M. Wiendi dan Ernawati. 1992. *Bioteknologi Tanaman*.Bogor: Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman Pusat Antar Universitas Bioteknologi IPB-Lembaga Sumberdaya Informasi IPB.
- Widiyanto, J. 2010. *SPSS For Windows untuk Analisis Data Statistik dan Penelitian*. Surakarta: BP-FKIP UMS.
- Wirawan, D. 2003. Pengaruh Konsentrasi BAP (6-Benzylaminopurin) terhadap Pertumbuhan (Kultur *in vitro*) Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* Scheff. Boerl.) Skripsi Mahasiswa Fakultas Kehutanan, Institut Pertanian Bogor
- Yanlinastuti, dan Fatimah, S. 2016. Pengaruh Konsentrasi Pelarut untuk Menentukan Kadar Zirkonium dalam Panduan U-Zr dengan Menggunakan Metode Spektrofotometri UV-Vis. Banten: Badan Tenaga Nuklir Nasional.
- Yelnitis. 2012. Pembentukan Kalus Remah dari Eksplan Daun Ramin. *Jurnal Pemuliaan Tanaman Hutan*. 6 (3).
- Yuliarti, N. 2010. *Kultur Jaringan Tanaman Skala Rumah Tangga*. Yogyakarta: Lily Publisher.
- Yusnita. 2003. *Kultur Jaringan : Cara Memperbanyak Tanaman Secara Efisien*. Jakarta: Agro Medika Pustaka.
- Yuwono, T. 2006. *Bioteknologi Pertanian*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Zaer and Mapes. 1982. *Action of Growth Regeneration*. In Bonga and Durzan (eds.) *Tissue Culture in Forestry*. London: Martinus Nijhoff.
- Zhang, Y, Mian, M. R, and Bouton, J. H. Recent Molecular and Genomic Studies on Stress Tolerance of Forage and Turf Grasses. *Crop Sci*.
- Zulhilmi, Suwirman dan Netty W S. 2012. Pertumbuhan dan Uji Kualitatif Kandungan Metabolit Sekunder Kalus Gatang (*Spilanthus acmell*

Murr) dengan Penambahan PEG untuk Menginduksi Cekaman Kekeringan. *Jurnal Biologi Universitas Andalas*. 1 (1).

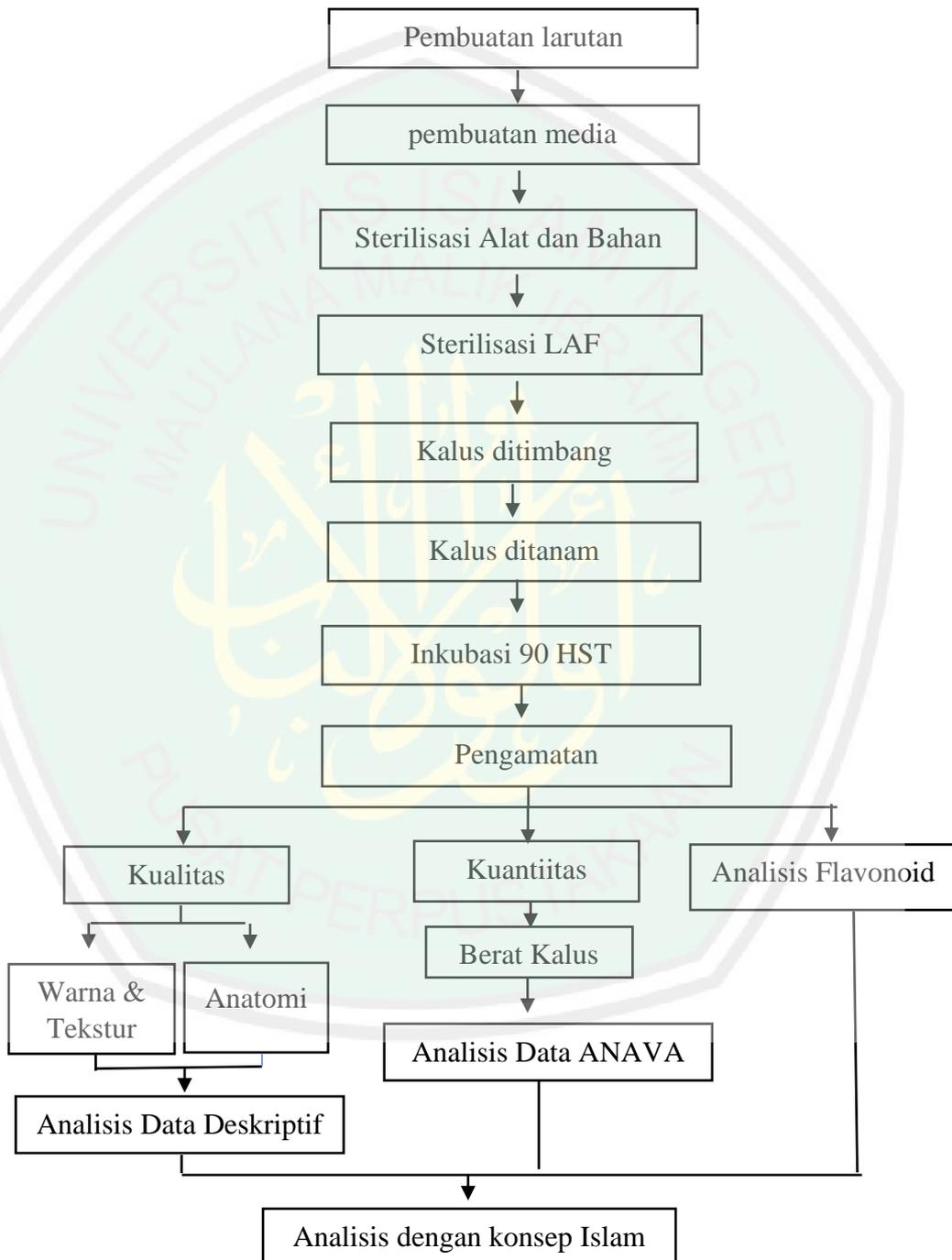
Zulkarnain. 2009. *Kultur Jaringan Tanaman: Solusi Perbanyak Tanaman Budidaya*. Jakarta: Bumi Aksara.

Zulkarnain. 2011. *Kultur Jaringan Tanaman*. Jakarta: Bumi Aksara



LAMPIRAN

Lampiran 1 Alur Kerja Penelitian



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

No.	Unsur	Mg/liter
Unsur Makro		
3.	KNO ₃	1.900
4.	NH ₄ NO ₃	1.650
3.	MgSO ₄ . 7H ₂ O	370
4.	CaCl ₂ .2H ₂ O	332,2
5.	KH ₂ PO ₄	170
Unsur Mikro		
2.	Na ₂ EDTA	37,3
2.	FeSO ₄ . 7H ₂ O	27,8
3.	MnSO ₄ .H ₂ O	16,9
4.	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
5.	H ₃ BO ₃	6,2
6.	KI	0,83
7.	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
8.	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
9.	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025

Lampiran 3 Perhitungan dan Pengambilan Larutan Stok Hormon dan Kitosan**a. Larutan stok 2,4-D 100 ppm dalam 100 ml**

$$\text{Larutan stok 2,4-D 100 ppm} = \frac{100 \text{ mg}}{1 \text{ L}} = \frac{100 \text{ mg}}{1000 \text{ nl}} = \frac{10 \text{ mg}}{100 \text{ nl}}$$

b. Larutan stok BA 100 ppm dalam 100 ml

$$\text{Larutan stok BA 100 ppm} = \frac{100 \text{ mg}}{1 \text{ L}} = \frac{100 \text{ mg}}{1000 \text{ nl}} = \frac{10 \text{ mg}}{100 \text{ nl}}$$

c. Larutan stok Kitosan 100 ppm dalam 100 ml

$$\text{Larutan stok kitosan 100 ppm} = \frac{100 \text{ mg}}{1 \text{ L}} = \frac{100 \text{ mg}}{1000 \text{ nl}} = \frac{10 \text{ mg}}{100 \text{ nl}}$$

Perhitungan stok hormon untuk pembuatan media perlakuan

1. Perlakuan pemberian hormon 2,4-D sebanyak 1 mg/l

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

$$100 \text{ mg/l} \times V1 = 1 \text{ mg/l} \times 50 \text{ ml}$$

$$V1 = \frac{1 \text{ mg/l} \times 50 \text{ ml}}{100 \text{ mg/l}} = 0,5 \text{ ml}$$

2. Perlakuan pemberian hormon BA sebanyak 1 mg/l

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

$$100 \text{ mg/l} \times V1 = 1 \text{ mg/l} \times 50 \text{ ml}$$

$$V1 = \frac{1 \text{ mg/l} \times 50 \text{ ml}}{100 \text{ mg/l}} = 0,5 \text{ ml}$$

Lampiran 4 Perhitungan Konsentrasi Kitosan (mg/l)

No.	Perlakuan	Larutan (ml)	Kitosan (ml)
1.	KT 1	100	0
2.	KT 2	99,5	0,5
3.	KT 3	99	1
4.	KT 4	98,5	1,5
5.	KT 5	98	2
6.	KT 6	97,5	2,5

Lampiran 5 Data Hasil Rata-rata Berat Kalus Tanaman Kesambi (*Schleichera oleosa* (Lour.) Merr)

Perlakuan	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Ulangan 4	Jumlah	Rata- rata
KT 0 mg/l	0,24 g	0,2 g	0,26 g	0,21 g	0,90 g	0,23 g
KT 0,5 mg/l	0,25 g	0,28 g	0,31 g	0,27 g	1,1 g	0,27 g
KT 1 mg/l	0,28 g	0,34 g	0,29 g	0,31 g	1,21 g	0,30 g

KT 1,5 mg/l	0,37 g	0,41 g	0,34 g	0,34 g	1,46 g	0,36 g
KT 2 mg/l	0,38 g	0,45 g	0,48 g	0,33 g	1,65 g	0,41 g
KT 2,5 mg/l	0,44 g	0,53 g	0,42 g	0,46 g	1,85 g	0,47 g

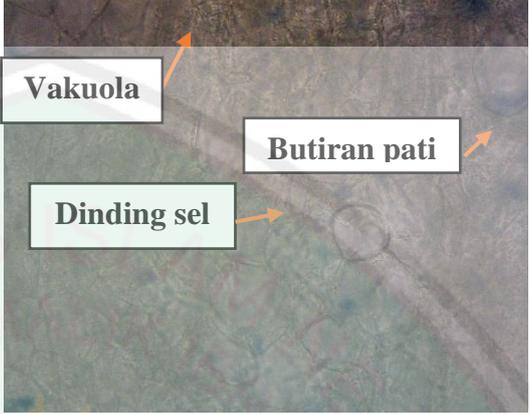
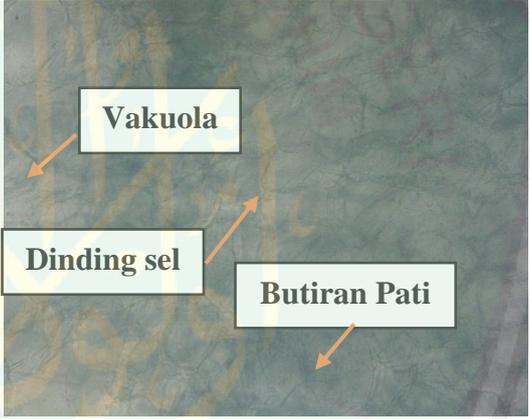
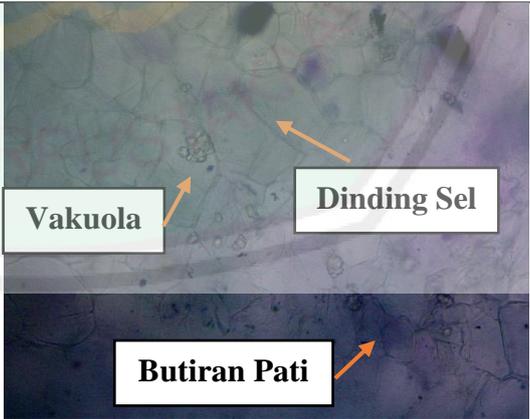
Lampiran 6 Warna Kalus Kesambi pada Media Perlakuan Konsentrasi Kitosan yang Berbeda-beda

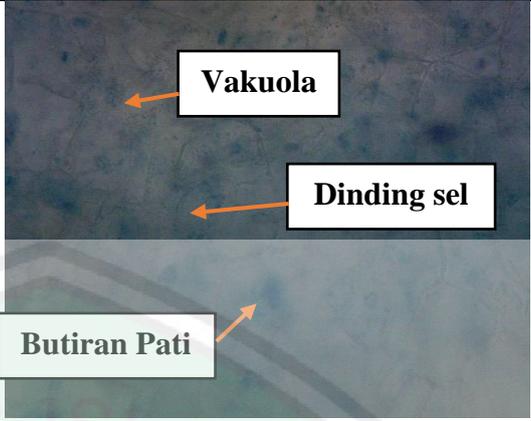
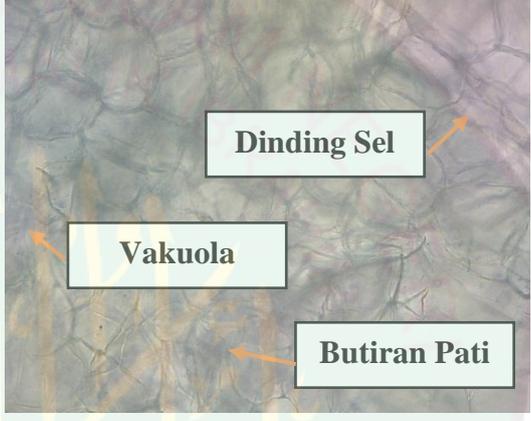
Perlakuan	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Ulangan 4
KT 0 mg/l	Kecoklatan	Kecoklatan	Kecoklatan	Kecoklatan
KT 0,5 mg/l	Kecoklatan	Kecoklatan	Kecoklatan	Kecoklatan
KT 1 mg/l	Kecoklatan	Kecoklatan	Kecoklatan	Kecoklatan
KT 1,5 mg/l	Hijau kecoklatan	Hijau kecoklatan	Kecoklatan	Kecoklatan
KT 2 mg/l	Hijau kecoklatan	Hijau kecoklatan	Kecoklatan	Hijau kecoklatan
KT 2,5 mg/l	Hijau	Hijau	Hijau	Hijau Kecoklatan

Lampiran 7 Tekstur Kalus Kesambi pada Media Perlakuan Konsentrasi Kitosan yang Berbeda-beda

Perlakuan	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Ulangan 4
KT 0 mg/l	Kompak	Kompak	Kompak	Kompak
KT 0,5 mg/l	Kompak	Kompak	Kompak	Kompak
KT 1 mg/l	Kompak	Kompak	Kompak	Kompak
KT 1,5 mg/l	Kompak	Kompak	Kompak	Kompak
KT 2 mg/l	Kompak	Kompak	Kompak	Kompak
KT 2,5 mg/l	Kompak	Kompak	Kompak	Kompak

Lampiran 8 Hasil Identifikasi Kalus Kesambi dengan Menggunakan Mikroskop sebesar 400x

No.	Perlakuan	Gambar Pengamatan
1.	2,4-D 1 mg/l+ BA 1 mg/l+Kitosan 0 mg/l	
2.	2,4-D 1 mg/l+ BA 1 mg/l+Kitosan 0,5 mg/l	
3.	2,4-D 1 mg/l+ BA 1 mg/l+Kitosan 1 mg/l	

<p>4.</p>	<p>2,4-D 1 mg/l+ BA 1 mg/l+Kitosan 1,5 mg/l</p>	 <p>Vakuola</p> <p>Dinding sel</p> <p>Butiran Pati</p>
<p>5.</p>	<p>2,4-D 1 mg/l+ BA 1 mg/l+Kitosan 2 mg/l</p>	 <p>Dinding Sel</p> <p>Vakuola</p> <p>Butiran Pati</p>
<p>6.</p>	<p>2,4-D 1 mg/l+ BA 1 mg/l+Kitosan 2,5 mg/l</p>	 <p>Vakuola</p> <p>Dinding Sel</p> <p>Butiran Pati</p>

Lampiran 9 Perhitungan manual hasil penelitian kandungan total flavonoid pada kalus kesambi



KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
JURUSAN KIMIA
Gedung Sains dan Teknologi UIN Malang Lt.2 Jl. Gajayana 50 Malang Telp./Fax +62341558933
www.uin-malang.ac.id Email: info uin@uin-malang.ac.id, kimia@uin-malang.ac.id

LAPORAN HASIL PENGUJIAN

Nama konsumen : Dwi Ariskha Wulan Suci
Instansi Asal/Jurusan : UIN Malang/Biologi
Nama sampel : Daun dan kalus Kesambi
Jumlah sampel : 7
Jenis Uji : Total Flavonoid secara spektrofotometri
Tgl Penyerahan sampel : 29 Juli 2020
Tanggal pengujian : 3 Agustus 2020

A. Prosedur Analisa

1. Pembuatan larutan standar quersetin
Dibuat larutan induk quersetin 1000 ppm dengan cara ditimbang 25 mg quersetin dan dilarutkan dengan methanol 80% hingga volume 25 mL. Selanjutnya dibuat larutan standar quersetin dengan konsentrasi 5 ppm, 25 ppm, 50 ppm, 100 ppm, 200 ppm, dan 300 ppm dengan cara dipipet larutan induk quersetin sebanyak 0,05 mL; 0,25 mL; 0,5 mL; 1 mL; 2 mL; dan 3 mL kemudian diencerkan dengan aquadest sampai volume 10 mL.
2. Pengukuran larutan standar quersetin
Dipipet masing-masing larutan standar quersetin sebanyak 1 mL, ditambahkan 4 mL aquadest dan 0,3 mL NaNO₃ 5%, kemudian larutan divortex dan didiamkan selama 5 menit. Selanjutnya larutan ditambahkan 0,3 mL AlCl₃ 10%, 2 mL NaOH 1 M, dan ditambah aquadest hingga volume total 10 ml. Setelah itu, larutan dihomogenkan dan didiamkan selama 5 menit. Absorbansi diukur dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 352 nm.
3. Ekstraksi kalus dan daun kesambi
Ditimbang kalus dan daun kesambi segar masing-masing sebanyak 0,5 gram dan dimasukkan ke dalam mortar. Kalus dan daun tersebut dihaluskan dengan menggunakan alu. Kalus dan daun yang sudah halus direndam menggunakan pelarut methanol 80% sebanyak 5 mL di dalam tabung reaksi. Kemudian campuran tersebut divortex selama 5 menit dan dishaker selama 2 jam. Kalus dan daun yang sudah diekstraksi dibiarkan selama 24 jam.



4. Penetapan total flavonoid ekstrak kalus dan daun kesambi

Dipipet masing-masing larutan ekstrak kalus dan daun kesambi sebanyak 1 ml, ditambahkan 4 mL aquadest dan 0,3 mL NaNO_3 5%, kemudian larutan divortex dan didiamkan selama 5 menit. Selanjutnya larutan ditambahkan 0,3 mL AlCl_3 10%, 2 mL NaOH 1 M, dan ditambah aquadest hingga volume total 10 ml. Setelah itu, larutan dihomogenkan dan didiamkan selama 5 menit. Absorbansi diukur dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 352 nm. Kadar flavonoid diperoleh sebagai mg ekuivalen quersetin/g ekstrak (mg QE/g).

B. Perhitungan kadar Flavonoid Total:

Persamaan dari kurva baku quersetin adalah :

$$Abs = 0,00452 \times \text{Con.c} + 0,03399$$

$$C_{\text{sampel}} = \frac{Abs - 0,03399}{0,00452}$$

$$\text{kadar total flavonoid } (\mu\text{g QE/g}) = \frac{C \times V}{m}$$

Dimana :

C = konsentrasi sampel ($\mu\text{g/mL}$)

V = volume ekstrak sampel (mL)

m = berat sampel

Data berat, volume, dan absorbansi sampel

Nama sampel	Berat sampel (gram)	Volume sampel yang dipipet (mL)	Absorbansi sampel
KT 0	0,5000	1 mL	0,3167
KT 0,5	0,5000	1 mL	0,4999
KT 1	0,5002	1 mL	0,4468
KT 1,5	0,5001	1 mL	0,3820
KT 2	0,5000	1 mL	0,1973
KT 2,5	0,5001	1 mL	0,5540
Daun	0,5003	1 mL	1,3913



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

Gedung Sains dan Teknologi UIN Malang Lt.2 Jl. Gajayana 50 Malang Telp./Fax +62341558933
www.uin-malang.ac.id Email: info uin@uin-malang.ac.id, kimia@uin-malang.ac.id

Contoh perhitungan kadar total flavonoid pada sampel KT 0:

$$C_{\text{sampel}} = \frac{Abs - 0,03399}{0,00452}$$

$$C_{\text{KT0}} = \frac{0,3167 - 0,03399}{0,00452} \mu\text{g/mL}$$

$$C_{\text{KT0}} = 62,55 \mu\text{g/mL}$$

$$\text{kadar total flavonoid } (\mu\text{g QE/g}) = \frac{62,55 \mu\text{g/mL} \times 1 \text{ mL}}{0,5000 \text{ g}}$$

$$\text{kadar total flavonoid} = 125,09 \mu\text{g QE/g}$$

Data konsentrasi dan kadar total flavonoid sampel

Pelarut	C sampel ($\mu\text{g/mL}$)	Kadar total flavonoid sampel ($\mu\text{g QE/g}$)
KT 0	62,55	125,09
KT 0,5	103,08	206,15
KT 1	91,33	182,59
KT 1,5	76,99	153,96
KT 2	36,13	72,26
KT 2,5	115,05	230,05
Daun	300,29	600,22

Demikian laporan hasil pengujian ini dikeluarkan untuk diketahui dan di gunakan seperlunya, atas perhatian dan kepercayaanya diucapkan terima kasih.

Malang, 06 Agustus 2020

Analisis

Mei Rhomawati, S.Si

Lampiran 10 Perhitungan SPSS Hasil Rata-rata Berat Kalus Kesambi

Uji Normalitas

Tests of Normality

KITOSAN		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
BERAT	0	.231	4	.	.948	4	.704
	0,5	.210	4	.	.982	4	.911
	1	.215	4	.	.946	4	.689
	1,5	.275	4	.	.854	4	.241
	2	.222	4	.	.954	4	.740
	2,5	.327	4	.	.881	4	.341

a. Lilliefors Significance Correction

Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

BERAT

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.246	5	18	.094

ANOVA

BERAT

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.154	5	.031	18.388	.000
Within Groups	.030	18	.002		
Total	.184	23			

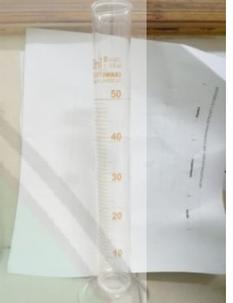
Uji Lanjut dengan Menggunakan DMRT taraf 5%

BERAT						
Duncan						
KITOSAN	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
0	4	.2267				
0,5	4	.2775	.2775			
1	4		.3050	.3050		
1,5	4			.3650	.3650	
2	4				.4100	.4100
2,5	4					.4625
Sig.		.096	.355	.053	.137	.086
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.						

Lampiran 11 Alat dan Bahan

Alat



			
Hot plate	Botol Balsam	Cawan Petri	LAF
			
Busen	Korek	Beaker Glass	Gelas Ukur
			
Mikropipet	Spektrofotometri Uv-Vis	Vortex	Shaker
			
Plastik, Karet, Kertas Label		Alat Diseksi	

Bahan

 <p>Hormon stok</p>	 <p>Media MS</p>	 <p>Gula</p>	 <p>Agar</p>
 <p>Kitosan</p>	 <p>Alkohol 70%, 96% dan Spirtus</p>	 <p>Tisu</p>	 <p>NaOH dan HCl</p>
 <p>Asam Asetat</p>	 <p>Kuersetin</p>	 <p>Mata Pisau</p>	 <p>Kalus Kesambi</p>



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

BUKTI KONSULTASI SKRIPSI

Nama : Dwi Ariskha Wulan Suci
NIM : 16620045
Program Studi : S1 Biologi
Semester : Ganjil/Genap TA. 2019/2020
Pembimbing : Ruri Siti Resmisari, M. Si
Judul Skripsi : Pengaruh Kitosan Terhadap Kandungan Flavonoid pada Kalus
Kesambi (*Schleichera oleosa*) Secara *In Vitro*

No.	Tanggal	Uraian Materi Konsultasi	Ttd. Pembimbing
1.	27-11-2019	Teknik Penyusun BAB I	Rms
2.	29-11-2019	Penentuan Elisitor	Rms
3.	3-12-2019	Penentuan Konsentrasi Kitosan	Rms
4.	12-12-2019	Penyusunan Proposal	Rms
5.	23-12-2019	BAB I	Rms
6.	26-12-2019	BAB I	Rms
7.	27-12-2019	BAB I dan III	Rms
8.	7-01-2020	BAB I, II dan III	Rms
9.	13-01-2020	BAB I, II, dan III	Rms
10.	16-01-2020	ACC Proposal	Rms
11.	19-08-2020	BAB I dan IV	Rms
12.	30-08-2020	BAB I, II, III, IV, V, daftar pustaka, lampiran	Rms
13.	2-09-2020	ACC Skripsi	Rms

Pembimbing Skripsi,

Ruri Siti Resmisari, M. Si
NIP. 19790123301608012063



Malang, 29 September 2020
Ketua Program Studi Biologi,

Dr. Evika Sandi Savitri, M.P
NIP. 197410182003122002



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

BUKTI KONSULTASI SKRIPSI

Nama : Dwi Ariskha Wulan Suci
NIM : 16620045
Program Studi : S1 Biologi
Semester : Ganjil/Genap TA. 2019/2020
Pembimbing : M. Mukhlis Fahrudin, M.SI
Judul Skripsi : Pengaruh Kitosan Terhadap Kandungan Flavonoid pada Kalus Kesambi (*Schleichera oleosa*) Secara *In Vitro*

No.	Tanggal	Uraian Materi Konsultasi	Ttd. Pembimbing
1.	14-01-2020	Integrasi BAB I dan II	
2.	15-01-2020	Menambah Hadist tentang obat	
3.	30-01-2020	ACC proposal	
4.	31-08-2020	BAB IV	
5.	01-09-2020	ACC Skripsi	

Pembimbing Skripsi,

M. Mukhlis Fahrudin, M. SI
NIPT. 20142011409

Malang, 29 September 2020
Ketua Program Studi Biologi,

Dr. Evika Sandi Savitri, M.P
NIP. 197410182003122002

