

**PENGARUH BERBAGAI KONSENTRASI PEG (*Polyethylen Glycol*) 6000  
TERHADAP KUALITAS DAN KUANTITAS KALUS SERTA UJI  
KUALITATIF METABOLIT SEKUNDER VERNODALIN PADA KALUS  
DAUN AFRIKA (*Vernonia amygdalina*)**

**SKRIPSI**



**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI  
MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG  
2015**

**PENGARUH BERBAGAI KONSENTRASI PEG (*Polyethylen Glycol*) 6000  
TERHADAP KUALITAS DAN KUANTITAS KALUS SERTA UJI  
KUALITATIF METABOLIT SEKUNDER VERNODALIN PADA KALUS  
DAUN AFRIKA (*Vernonia amygdalina*)**

**SKRIPSI**

**Diajukan Kepada:  
Fakultas Sains dan Teknologi  
Universitas Islam Negeri  
Maulana Malik Ibrahim Malang  
Untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan Dalam  
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)**

**Oleh:  
AGUSTIN MAULINA ARIANTI  
NIM. 11620048 / S-1**

**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI  
MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG  
2015**

**PENGARUH BERBAGAI KONSENTRASI PEG (*Polyethylen Glycol*) 6000  
TERHADAP KUALITAS DAN KUANTITAS KALUS SERTA UJI  
KUALITATIF METABOLIT SEKUNDER VERNODALIN PADA KALUS  
DAUN AFRIKA (*Vernonia amygdalina*)**

**SKRIPSI**

**Oleh:**

**AGUSTIN MAULINA ARIANTI**

**NIM. 11620048**

Telah diperiksa dan disetujui oleh untuk diuji:  
Tanggal: 4 November 2015

Pembimbing I



Dr. Retno Susilowati, M.Si  
NIP. 19671113 199402 2 001

Pembimbing II



Umairatus Syarifah, M. A  
NIP. 19820925 200901 2 005

Mengetahui,  
Ketua Jurusan Biologi



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

**PENGARUH BERBAGAI KONSENTRASI PEG (*Polyethylen Glycol*) 6000  
TERHADAP KUALITAS DAN KUANTITAS KALUS SERTA UJI  
KUALITATIF METABOLIT SEKUNDER VERNODALIN PADA KALUS  
DAUN AFRIKA (*Vernonia amygdalina*)**

**SKRIPSI**

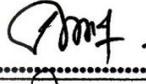
**Oleh:**

**AGUSTIN MAULINA ARIANTI**

**NIM. 11620048**

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi  
dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan  
untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)

Tanggal : 6 November 2015

Penguji Utama	<u>Dr. Evika Sandi Savitri, M.P</u> NIP. 19741018 200312 2 002	
Ketua Penguji	<u>Ruri Siti Resmisari, M.Si</u> NIPT. 201402012423	
Sekretaris Penguji	<u>Dr. Retno Susilowati, M.Si</u> NIP. 19671113 199402 2 001	
Anggota Penguji	<u>Umaiatus Syarifah, M.A</u> NIP. 19820925 200901 2 005	

Mengesahkan,  
Ketua Jurusan Biologi



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

## PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Agustin Maulina Arianti  
NIM : 11620048  
Jurusan : Biologi  
Fakultas : Sains dan Teknologi  
Judul Skripsi : Pengaruh Berbagai Konsentrasi PEG (*Polyethylen Glycol*) 6000 Terhadap Kualitas Dan Kuantitas Kalus Serta Uji Kualitatif Metabolit Sekunder Vernodalin Pada Kalus Daun Afrika (*Vernonia amygdalina*).

menyatakan dengan sebenarnya bahwa tugas akhir atau skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambil alihan 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 di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan tugas akhir/skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 23 November 2015

Yang membuat pernyataan,



Agustin Maulina Arianti

NIM. 11620048

## MOTTO

*Setiap kerja keras yang kita lakukan dengan sungguh-sungguh dan disertai dengan do'a, maka hasilnya akan lebih indah dari yang kita bayangkan. . .*

*Percayalah bahwa Allah akan memberikan kita hasil yang terbaik, asalkan kita mau berusaha dan tentunya disertai dengan do'a. . .*

*“ Ikhtiyar – Tawakal – Do'a ”*

## LEMBAR PERSEMBAHAN

Tiada kata terindah selain mengucapkan syukur yang sebesar-besarnya kepada Allah ﷻ dan junjungan kita Nabi Muhammad ﷺ yang senantiasa melimpahkan nikmat dan rahmat-Nya kepada kami...

Dengan terselesainya tugas akhir ini, maka kupersembahkan karya ini kepada:

Bapak Bari Arianto dan Ibu Nanik Sugiarti yang selalu memberikan dukungan, motivasi, semangat dan do'a yang tiada henti dipanjatkan dalam setiap sujudnya.. serta Adik perempuanku Alifia Citra Resti yang selalu memberikan semangat, do'a dan cintanya kepadaku... Tak lupa teman-teman di lab kultur; ummik, windi, yogi, uun serta teman-teman kontrakan pink; Ummi Dyah, Simut, Ningsih, Anggik, Pipit, Ipik, dan Mbak Tara yang telah menjadi sahabat terbaikku selama studi dan sampai nanti..

Dan semua teman-teman satu angkatan Jurusan Biologi 2011 yang telah bersama-sama mengukir indahnya persahabatan hingga akhir, Serta semua yang telah membantu terealisasinya skripsi ini, semoga Allah selalu melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya kepada kita semua..

Aamiin ..

## PEDOMAN TRANSLITERASI ARAB LATIN

Penulisan transliterasi Arab-Latin dalam skripsi ini menggunakan pedoman transliterasi berdasarkan keputusan bersama Menteri Agama RI dan Menteri Pendidikan dan Kebudayaan RI no.158 tahun 1987 dan no.0543 b/U/1987 yang secara garis besar dapat diuraikan sebagai berikut:

### 1. Konsonan

No	Arab	Latin	No	Arab	Latin
1	ا	Tidak dilambangkan	16	ط	ṭ
2	ب	b	17	ظ	ẓ
3	ت	t	18	ع	‘
4	ث	ṯ	19	غ	g
5	ج	j	20	ف	f
6	ح	ḥ	21	ق	q
7	خ	kh	22	ك	k
8	د	d	23	ل	l
9	ذ	ẓ	24	م	m
10	ر	r	25	ن	n
11	ز	z	26	و	w
12	س	s	27	ه	h
13	ش	sy	28	ء	‘
14	ص	ṣ	29	ي	y
15	ض	ḍ			

### 2. Vokal Pendek

َ = a    كَتَبَ kataba    َ... = ā    قَالَ qāla  
 ِ = i    سُوِّلَ su'ila    ِئِ = ī    قِيلَ qila  
 ُ = u    يَذْهَبُ yaẓhabu    ُؤِ = ū    يَقُولُ yaqūlu

### 3. Vokal Panjang

### 4. Diftong

َايْ = ai    كَيْفَ kaifa  
 َاوْ = au    هَاوْلَ ḥaula

## KATA PENGANTAR

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

*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 Berbagai Konsentrasi PEG (*Polyethylen Glycol*) 6000 Terhadap Kualitas Dan Kuantitas Kalus Serta Uji Kualitatif Metabolit Sekunder Vernodalin Pada Kalus Daun Afrika (*Vernonia amygdalina*)”. Shalawat serta salam senantiasa tercurahkan kepada baginda rasul Muhammad SAW beserta keluarga dan sahabatnya.

Selanjutnya penulis haturkan ucapan terimakasih seiring doa dan harapan *jazakumullah ahsanal jaza'* kepada semua pihak yang telah membantu terselesaikannya skripsi ini. Ucapan terimakasih ini penulis sampaikan kepada:

1. Prof. Dr. H. Mudjia Rahardjo, M.Si, selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Maflik Ibrahim Malang.
2. Dr. drh. Hj. Bayyinatul Muchtaromah, M.Si, selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Dr. Evika Sandi Savitri, M.P, selaku Ketua Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Dr. Retno Susilowati, M.Si, sebagai dosen pembimbing yang telah sabar memberikan bimbingan, arahan dan memberikan waktu untuk membimbing penulis sehingga skripsi ini terselesaikan dengan baik. Semoga Allah SWT selalu melimpahkan Rahmat-Nya kepada beliau dan keluarga.
5. Umayyatus Syarifah, M.A, sebagai dosen pembimbing integrasi sains dan agama yang memberikan arahan serta pandangan sains dari perspektif Islam sehingga skripsi ini terselesaikan dengan baik. Semoga Allah SWT selalu melimpahkan Rahmat-Nya kepada beliau dan keluarga. Amin.

6. Dr. Evika Sandi Savitri, M.P, Ruri Siti Resmisari, M.Si sebagai dosen penguji dan dosen pembimbing lapangan yang telah memberikan ilmu yang sangat berguna bagi penulis.
7. Mujahidin Ahmad, M.Sc sebagai dosen wali yang telah banyak memberikan saran dan motivasi selama perkuliahan.
8. Segenap Bapak/Ibu Dosen dan Laboran Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang yang telah memberikan bimbingan kepada penulis.
9. Ayah, Ibu dan Adikku yang selalu memberikan dukungan penuh, semangat yang luar biasa dan do'a yang tiada henti sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan lancar.
10. Seluruh teman-teman Biologi angkatan 2011 dan teman-teman satu kontrakan yang bersama-sama berjuang untuk mencapai kesuksesan yang diimpikan.
11. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu-persatu yang turut membantu dalam menyelesaikan skripsi ini baik berupa materiil maupun moril.

Semoga Allah SWT memberikan balasan atas bantuan dan do'a yang diberikan kepada penulis. Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan skripsi ini masih terdapat kekurangan dan penulis berharap skripsi ini bisa memberikan manfaat bagi penulis khususnya, bagi pembaca pada umumnya. *Amin Ya Rabbal Alamin.*  
*Wassalamu'alaikum Wr. Wb.*

Malang, 23 November 2015

Penulis

## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	<b>i</b>
<b>HALAMAN PENGAJUAN</b> .....	<b>ii</b>
<b>HALAMAN PERSETUJUAN</b> .....	<b>iii</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	<b>iv</b>
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	<b>v</b>
<b>HALAMAN MOTTO</b> .....	<b>vi</b>
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN</b> .....	<b>vii</b>
<b>PEDOMAN TRANSLITERASI</b> .....	<b>viii</b>
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	<b>ix</b>
<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>xi</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>xiv</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>xv</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	<b>xvi</b>
<b>ABSTRAK</b> .....	<b>xvii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>xviii</b>
<b>خلاصة</b> .....	<b>xix</b>
<b>BAB I PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	10
1.3 Tujuan Penelitian .....	11
1.4 Hipotesis .....	11
1.5 Manfaat Penelitian .....	11
1.6 Batasan Masalah .....	12
<b>BAB II KAJIAN PUSTAKA</b>	
2.1 Daun Afrika ( <i>Vernonia amygdalina</i> ) .....	13
2.1.1 Klasifikasi .....	13
2.1.2 Deskripsi dan Morfologi Daun Afrika .....	13
2.1.3 Kandungan Senyawa Bioaktif dan Khasiat Penggunaan .....	15
2.1.4 Senyawa Vernodalin .....	16
2.2 Kultur Jaringan Tanaman (KJT) .....	17
2.2.1 Definisi Kultur Jaringan Tanaman .....	17
2.2.2 Faktor-Faktor Yang Mempengaruhi KJT.....	19
2.2.3 Tipe Kultur Jaringan Tanaman.....	24

2.2.4 Kultur Kalus .....	27
2.2.5 Teknik Kultur Kalus Untuk Memproduksi Metabolit Sekunder Suatu Tanaman.....	34
2.3 Metabolit Sekunder .....	36
2.4 PEG (Polietilen Glikol) .....	38
2.4.1 Definisi PEG (Polietilen Glikol) .....	38
2.4.2 Peran PEG dalam Menginduksi Metabolit Sekunder.....	40
2.5 LC-MS/MS ( <i>Liquid Chromatograph-tandem Mass Spectrometry</i> )	42

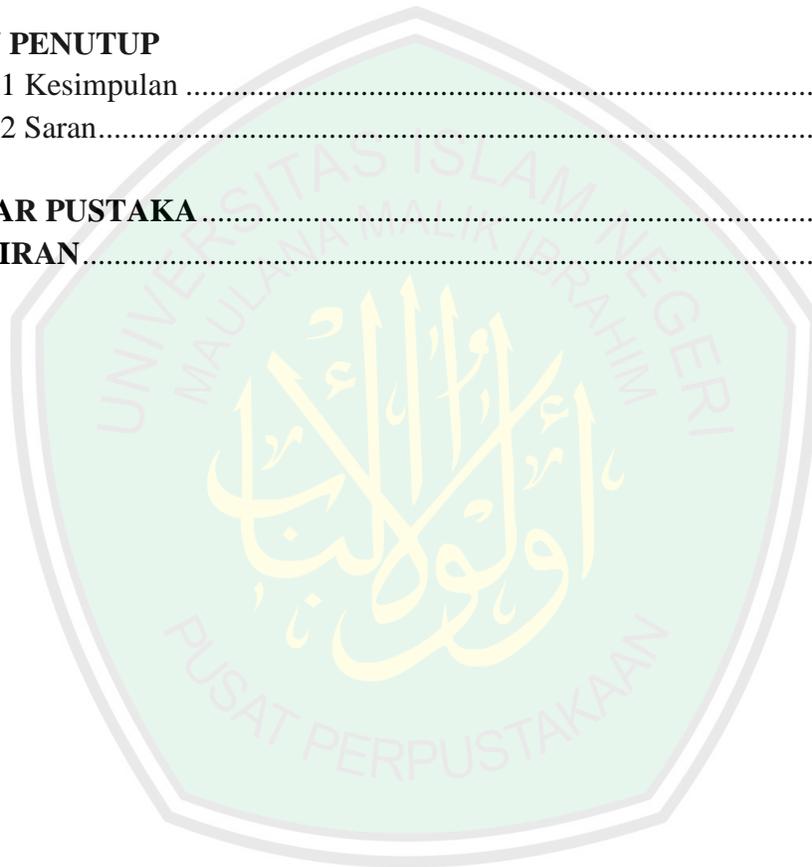
### **BAB III METODE PENELITIAN**

3.1 Rancangan Penelitian .....	44
3.2 Tempat dan Waktu .....	44
3.3 Alat dan Bahan .....	44
3.3.1 Alat Penelitian.....	44
3.3.2 Bahan Penelitian.....	45
3.4 Prosedur Penelitian.....	45
3.4.1 Sterilisasi Alat dan Bahan .....	45
3.4.2 Pembuatan Larutan Stok ZPT .....	45
3.4.3 Pembuatan Larutan Stok PEG.....	46
3.4.4 Pembuatan Media Perlakuan.....	46
3.4.5 Sterilisasi Media.....	47
3.4.6 Sterilisasi Ruang Tanam .....	47
3.4.7 Tahap Perlakuan.....	47
3.4.7.1 Sterilisasi Eksplan .....	47
3.4.7.2 Inisiasi Eksplan .....	48
3.4.8 Tahap Pengamatan .....	48
3.4.9 Tahap Uji Kualitatif Metabolit Sekunder.....	49
3.4.9.1 Ekstraksi Kalus .....	49
3.4.9.2 Analisis LC-MS/MS .....	50
3.5 Analisis Data .....	50

### **BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN**

4.1 Pengaruh Konsentrasi PEG 6000 terhadap Kualitas Kalus (Warna dan Tekstur) Daun Afrika ( <i>Vernonia amygdalina</i> ).....	51
4.1.1 Pengaruh PEG 6000 terhadap Warna Kalus Daun Afrika ...	53
4.1.2 Pengaruh PEG 6000 terhadap Tekstur Kalus Daun Afrika .	54

4.2 Pengaruh Konsentrasi PEG 6000 terhadap Kuantitas Daun Afrika ( <i>Vernonia amygdalina</i> ).....	56
4.2.1 Hari Muncul Kalus.....	60
4.2.2 Persentase Tumbuh Kalus.....	62
4.2.3 Berat Kalus.....	64
4.3 Uji Kualitatif Metabolit Sekunder Vernodalin Pada Kalus Daun Afrika ( <i>Vernonia amygdalina</i> ).....	66
<b>BAB V PENUTUP</b>	
5.1 Kesimpulan.....	72
5.2 Saran.....	73
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	74
<b>LAMPIRAN</b> .....	84



## DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Tipe Kultur Jaringan Tanaman dan Penggunaannya untuk Perbaikan Tanaman .....	25
Tabel 2.2 Ringkasan Senyawa yang Diidentifikasi Menggunakan MS, MS/MS dan UV-spectra .....	43
Tabel 4.1 Gambar Pengamatan Kalus Daun afrika .....	51
Tabel 4.2 Pengaruh Konsentrasi PEG 6000 terhadap Kuantitas Kalus .....	56



## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Tanaman Daun Afrika ( <i>Vernonia aygdalina</i> ) .....	14
Gambar 2.2 Struktur Beberapa Kandungan Kimia yang Ditemukan di daun <i>Vernonia amygdalina</i> .....	16
Gambar 2.3 Struktur Kimia Vernodalin.....	17
Gambar 2.4 Beberapa Tekstur Kalus Pegagan ( <i>Centella asiatica</i> ).....	31
Gambar 2.5 Kategori Skoring Warna Kalus pada Eksplan Jarak Pagar .....	32
Gambar 2.6 Bagan Hubungan Biosintesis Metabolit Primer Menjadi Metabolit Sekunder .....	37
Gambar 2.7 Struktur PEG .....	38
Gambar 4.1 Grafik Hari Muncul Kalus.....	60
Gambar 4.2 Grafik Persentase Tumbuh Kalus.....	63
Gambar 4.3 Grafik Rata-Rata Berat Kalus .....	65
Gambar 4.4 Kromatogram terdeteksinya Vernodalin menggunakan LC- MS/MS .....	69

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Komposisi Bahan Kimia pada Media MS (mg/l) .....	84
Lampiran 2 Perhitungan Konsentrasi PEG 6000 .....	84
Lampiran 3 Perhitungan Persentase Eksplan Berkalus .....	86
Lampiran 4 Warna Kalus pada Media PEG 6000 .....	90
Lampiran 5 Tekstur Kalus pada Media PEG 6000 .....	90
Lampiran 6 Hari Muncul Kalus .....	91
Lampiran 7 Berat Kalus .....	91
Lampiran 8 Gambar Hasil Uji Kualitatif Vernodalin menggunakan LC-MS/MS .....	92
Lampiran 9 Alat-Alat Penelitian .....	99
Lampiran 10 Bahan-Bahan Penelitian .....	100

## ABSTRAK

Arianti, Agustin Maulina. 2015. **Pengaruh Berbagai Konsentrasi PEG (*Polyethylen Glycol*) 6000 Terhadap Kualitas dan Kuantitas Kalus Serta Uji Kualitatif Metabolit Sekunder Vernodalin pada Kalus Daun Afrika (*Vernonia amygdalina*)**. Skripsi. Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

Pembimbing: Dr. Retno Susilowati, M.Si and Umaiatus Syarifah, M.A

---

**Kata Kunci** : Kalus daun afrika (*Vernonia amygdalina*), PEG 6000, Vernodalin.

Tumbuhan banyak dimanfaatkan oleh manusia dalam bidang pengobatan. Salah satu tanaman yang dimanfaatkan sebagai obat adalah daun afrika (*Vernonia amygdalina*). Daun afrika dapat dimanfaatkan untuk antikanker, antitumor, antibakteri. Melihat besarnya potensi kandungan daun afrika maka perlu dilakukan pengembangan yang mengarah pada budidaya dan perolehan kandungan metabolit sekunder. Salah satu teknik yang dapat dilakukan adalah kultur kalus. Pada penelitian ini, komposisi media ditambahkan berbagai konsentrasi PEG 6000 dengan tujuan dapat memberikan pengaruh terhadap kualitas dan kuantitas kalus daun afrika. Selain itu, penelitian ini juga melakukan uji kualitatif vernodalin pada kalus daun afrika.

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL), dengan menambahkan berbagai konsentrasi PEG 6000 yaitu 0 mg/l, 5 mg/l, 15 mg/l dan 25 mg/l pada media. Data kualitatif berupa pengamatan warna dan tekstur kalus dianalisis secara deskriptif, sedangkan data kuantitatif berupa hari muncul kalus, persentase tumbuh kalus dan berat kalus dianalisis menggunakan uji statistik *One Way ANOVA*, jika berbeda nyata maka diuji DMRT pada taraf 5 %. Uji kualitatif vernodalin dilakukan dengan menggunakan teknik LC-MS/MS.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan berbagai konsentrasi PEG 6000 pada media perlakuan tidak terdapat pengaruh yang nyata terhadap kualitas kalus daun afrika. Sedangkan penambahan berbagai konsentrasi PEG 6000 pada media perlakuan memberikan pengaruh yang berbeda nyata terhadap kuantitas kalus daun afrika. Kalus yang optimal pertumbuhannya adalah kalus pada perlakuan PEG 15 mg/l. Tetapi pertumbuhan kalus yang lebih efisien adalah perlakuan PEG 5 mg/l. Uji kualitatif vernodalin pada kalus daun afrika menggunakan LC-MS/MS menunjukkan bahwa pada media semua perlakuan, kalus daun afrika mengandung metabolit sekunder vernodalin.

## ABSTRACT

Arianti, Agustin Maulina. 2015. **Effect of Different Concentration of PEG (Polyethylene Glycol) 6000 on the Quality and Quantity Callus and also Qualitative Test Vernodalin Secondary Metabolites in Leaf Callus Africa (*Vernonia amygdalina*)**. Thesis. Department of Biology, Faculty of Science and Technology of the State Islamic University of Maulana Malik Ibrahim Malang.

Supervisor: Dr. Retno Susilowati, M.Si and Umaiatus Syarifah, M.A

---

**Keywords:** Leaf Callus Africa (*Vernonia amygdalina*), PEG 6000, Vernodalin.

Plants utilized by humans in the medical field. One of the plants were used as medicine is african leaf (*Vernonia amygdalina*). African leaf can be used for anticancer, antitumor, antibacterial. Of the magnitude of the potential content of the african leaf it is necessary to the development of the cultivation and content of secondary metabolites. One technique that can be done is a callus culture. In this study, the composition of the media is added PEG 6000 with the aim to give effect to the quality and quantity of leaf callus africa. This study was also conducted qualitative test vernodalin on leaf callus africa.

This study uses a completely randomized design (CRD), by adding a PEG 6000 concentration is 0 mg / l, 5 mg / l, 15 mg / l and 25 mg / l in the media. The qualitative data were analyzed descriptively on the color and texture of the callus, while quantitative data such as days grow callus, a growing percentage of callus and callus weight was analyzed using One Way ANOVA, if significantly different results then tested DMRT at 5%. Vernodalin qualitative test performed using LC-MS / MS.

The results showed that the addition of various concentrations of PEG 6000 on media treatment was not significantly different to the quality of leaf callus africa. While the addition of various concentrations of PEG 6000 on media treatment gives a significantly different effect on the quantity of leaf callus africa. Optimal callus growth is the PEG treatment of 15 mg / l. But callus growth more efficient is the treatment of PEG 5 mg / l. Qualitative test vernodalin on african leaf callus using LC-MS / MS that leaf callus africa contain secondary metabolites vernodalin in all media treatment.

## مستخلص البحث

اريتني، اكوستين مولنا . 2015. تأثير تركيزات PEG (فليوطلون كلجول) 6000 على نوعية وكمية كالوس واختبار الكيفي من مركبات ثانوية "فورنودلين" على كالوس في أوراق الأفريكا (فورنونيا امغدالني) ، البحث الجامعي، قسم علم الحياة، كلية العلوم والتكنولوجيا جامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية بمالانج.  
المشرفة الأولى: الدكتور رطنو سوسلوواتي الماجستير، والمشرفة الثانية: عمية الشريفة الماجستير.

### الكلمات الأساسية: كالوس أوراق الأفريكا (فورنونيا امغدالني)، PEG (فليوطلون كلجول) 6000، "فورنودلين"

أن كثير من الناس هم يستخدمون نباتا في مجال العلاج و احد من النبات التي تستخدمها وهي أوراق الأفريكا (فورنونيا امغدالني). وهذه الأوراق تستخدم لدواء الشرطان أو مضادة للشرطان، مضادة للورم ومضادة للبكتيريا. وعندما نظرت امكانية كبيرة في اوراق الأفريكا نحتاج ان نعمل تنمية إلى زراعة وحصول الى محتوى المركبات الثانوية. واما أسلوب المستخدم اليه وهو بأسلوب انسجة كالوس. وفي هذا البحث يضاف تكوين وسائل تركيزات PEG (فليوطلون كلجول) 6000 بهدف تستطسع ان تعطي آثارا على نوعية وكمية كالوس في أوراق الأفريكا (فورنونيا امغدالني) وعمل هذا البحث اختبارا نوعيا "فورنودلين" على كالوس في أوراق الأفريكا. واما الطريقة المستخدمة في هذا البحث وهي بطريقة تصميم كابل العشوائية بتزديد تركيزات PEG (فليوطلون كلجول) 6000 وهو 0mg/I, 5mg/I, 15 mg/I و 25mg/I على وسائلها. واما البيانات النوعي في هذا البحث وهي ملاحظة اللون ونسيج كالوس الذي تحلل وصغيا واما البيانات الكمي في هذا البحث وهي يوما المبدأ الكالوس، نسبة النمو كالوس ووزن كالوس الذي يحلل باستخدام اختبارا احصائيا بطريقة one way ANOVA ، وإذا كان مختلفا الخطوة الثانية هي باستخدام الطريقة DMRT على درجة 5%. واما جرى باختبارا نوعيا "فورنودلين" باستخدام الطريقة LC-MS/MS . واما النتائج من هذا البحث تدل على ان في تزديد تركيزات PEG (فليوطلون كلجول) 6000 على وسائله ليس آثارا عظيما على جودة أو نوعية كالوس في أوراق الأفريكا. واما في تزديد تركيزات PEG (فليوطلون كلجول) 6000 على وسائله آثارا مختلفا على جودة أو نوعية كالوس في أوراق الأفريكا. واما الكالوس النمو الأمثل هو كالوس في اجراء PEG 15 mg/I ولكن في نموها ان كالوس فعالا هو في اجراء 5mg/I. وفي اختبار نوعي "فورنودلين" على كالوس في أوراق الأفريكا باستخدام الطريقة LC-MS/MS وتدل على ان وسائل في كل اجراءات في كالوس في أوراق الأفريكا يحتوي المركبات الثانوية.

## ABSTRAK

Arianti, Agustin Maulina. 2015. **Pengaruh Berbagai Konsentrasi PEG (*Polyethylen Glycol*) 6000 Terhadap Kualitas dan Kuantitas Kalus Serta Uji Kualitatif Metabolit Sekunder Vernodalin pada Kalus Daun Afrika (*Vernonia amygdalina*)**. Skripsi. Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

Pembimbing: Dr. Retno Susilowati, M.Si and Umaiatus Syarifah, M.A

---

**Kata Kunci** : Kalus daun afrika (*Vernonia amygdalina*), PEG 6000, Vernodalin.

Tumbuhan banyak dimanfaatkan oleh manusia dalam bidang pengobatan. Salah satu tanaman yang dimanfaatkan sebagai obat adalah daun afrika (*Vernonia amygdalina*). Daun afrika dapat dimanfaatkan untuk antikanker, antitumor, antibakteri. Melihat besarnya potensi kandungan daun afrika maka perlu dilakukan pengembangan yang mengarah pada budidaya dan perolehan kandungan metabolit sekunder. Salah satu teknik yang dapat dilakukan adalah kultur kalus. Pada penelitian ini, komposisi media ditambahkan berbagai konsentrasi PEG 6000 dengan tujuan dapat memberikan pengaruh terhadap kualitas dan kuantitas kalus daun afrika. Selain itu, penelitian ini juga melakukan uji kualitatif vernodalin pada kalus daun afrika.

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL), dengan menambahkan berbagai konsentrasi PEG 6000 yaitu 0 mg/l, 5 mg/l, 15 mg/l dan 25 mg/l pada media. Data kualitatif berupa pengamatan warna dan tekstur kalus dianalisis secara deskriptif, sedangkan data kuantitatif berupa hari muncul kalus, persentase tumbuh kalus dan berat kalus dianalisis menggunakan uji statistik *One Way ANOVA*, jika berbeda nyata maka diuji DMRT pada taraf 5 %. Uji kualitatif vernodalin dilakukan dengan menggunakan teknik LC-MS/MS.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan berbagai konsentrasi PEG 6000 pada media perlakuan tidak terdapat pengaruh yang nyata terhadap kualitas kalus daun afrika. Sedangkan penambahan berbagai konsentrasi PEG 6000 pada media perlakuan memberikan pengaruh yang berbeda nyata terhadap kuantitas kalus daun afrika. Kalus yang optimal pertumbuhannya adalah kalus pada perlakuan PEG 15 mg/l. Tetapi pertumbuhan kalus yang lebih efisien adalah perlakuan PEG 5 mg/l. Uji kualitatif vernodalin pada kalus daun afrika menggunakan LC-MS/MS menunjukkan bahwa pada media semua perlakuan, kalus daun afrika mengandung metabolit sekunder vernodalin.

## ABSTRACT

Arianti, Agustin Maulina. 2015. **Effect of Different Concentration of PEG (Polyethylene Glycol) 6000 on the Quality and Quantity Callus and also Qualitative Test Vernodalin Secondary Metabolites in Leaf Callus Africa (*Vernonia amygdalina*)**. Thesis. Department of Biology, Faculty of Science and Technology of the State Islamic University of Maulana Malik Ibrahim Malang.

Supervisor: Dr. Retno Susilowati, M.Si and Umaiatus Syarifah, M.A

---

**Keywords:** Leaf Callus Africa (*Vernonia amygdalina*), PEG 6000, Vernodalin.

Plants utilized by humans in the medical field. One of the plants were used as medicine is african leaf (*Vernonia amygdalina*). African leaf can be used for anticancer, antitumor, antibacterial. Of the magnitude of the potential content of the african leaf it is necessary to the development of the cultivation and content of secondary metabolites. One technique that can be done is a callus culture. In this study, the composition of the media is added PEG 6000 with the aim to give effect to the quality and quantity of leaf callus africa. This study was also conducted qualitative test vernodalin on leaf callus africa.

This study uses a completely randomized design (CRD), by adding a PEG 6000 concentration is 0 mg / l, 5 mg / l, 15 mg / l and 25 mg / l in the media. The qualitative data were analyzed descriptively on the color and texture of the callus, while quantitative data such as days grow callus, a growing percentage of callus and callus weight was analyzed using One Way ANOVA, if significantly different results then tested DMRT at 5%. Vernodalin qualitative test performed using LC-MS / MS.

The results showed that the addition of various concentrations of PEG 6000 on media treatment was not significantly different to the quality of leaf callus africa. While the addition of various concentrations of PEG 6000 on media treatment gives a significantly different effect on the quantity of leaf callus africa. Optimal callus growth is the PEG treatment of 15 mg / l. But callus growth more efficient is the treatment of PEG 5 mg / l. Qualitative test vernodalin on african leaf callus using LC-MS / MS that leaf callus africa contain secondary metabolites vernodalin in all media treatment.

## مستخلص البحث

اريتني، اكوستين مولنا . 2015. تأثير تركيزات PEG (فليوطلون كلجول) 6000 على نوعية وكمية كالوس واختبار الكيفي من مركبات ثانوية "فورنودلين" على كالوس في أوراق الأفريكا (فورنونيا امغدالني) ، البحث الجامعي، قسم علم الحياة، كلية العلوم والتكنولوجيا جامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية بمالانج.  
المشرفة الأولى: الدكتور رطنو سوسلوواتي الماجستير، والمشرفة الثانية: عمية الشريفة الماجستير.

### الكلمات الأساسية: كالوس أوراق الأفريكا (فورنونيا امغدالني)، PEG (فليوطلون كلجول) 6000، "فورنودلين"

أن كثير من الناس هم يستخدمون نباتا في مجال العلاج و احد من النبات التي تستخدمها وهي أوراق الأفريكا (فورنونيا امغدالني). وهذه الأوراق تستخدم لدواء الشرطان أو مضادة للشرطان، مضادة للورم ومضادة للبكتيريا. وعندما نظرت امكانية كبيرة في اوراق الأفريكا نحتاج ان نعمل تنمية إلى زراعة وحصول الى محتوى المركبات الثانوية. واما أسلوب المستخدم اليه وهو بأسلوب انسجة كالوس. وفي هذا البحث يضاف تكوين وسائل تركيزات PEG (فليوطلون كلجول) 6000 بهدف تستطع ان تعطي آثارا على نوعية وكمية كالوس في أوراق الأفريكا (فورنونيا امغدالني) وعمل هذا البحث اختبارا نوعيا "فورنودلين" على كالوس في أوراق الأفريكا. واما الطريقة المستخدمة في هذا البحث وهي بطريقة تصميم كانال العشوائية بتزديد تركيزات PEG (فليوطلون كلجول) 6000 وهو 0mg/I, 5mg/I, 15 mg/I و 25mg/I على وسائلها. واما البيانات النوعي في هذا البحث وهي ملاحظة اللون ونسيج كالوس الذي تحلل وصغيا واما البيانات الكمي في هذا البحث وهي يوما المبدأ الكالوس، نسبة النمو كالوس ووزن كالوس الذي يحلل باستخدام اختبارا احصائيا بطريقة one way ANOVA ، وإذا كان مختلفا الخطوة الثانية هي باستخدام الطريقة DMRT على درجة 5%. واما جرى باختبارا نوعيا "فورنودلين" باستخدام الطريقة LC-MS/MS . واما النتائج من هذا البحث تدل على ان في تزديد تركيزات PEG (فليوطلون كلجول) 6000 على وسائله ليس آثارا عظيما على جودة أو نوعية كالوس في أوراق الأفريكا. واما في تزديد تركيزات PEG (فليوطلون كلجول) 6000 على وسائله آثارا مختلفا على جودة أو نوعية كالوس في أوراق الأفريكا. واما الكالوس النمو الأمثل هو كالوس في اجراء PEG 15 mg/I ولكن في نموها ان كالوس فعالا هو في اجراء 5mg/I. وفي اختبار نوعي "فورنودلين" على كالوس في أوراق الأفريكا باستخدام الطريقة LC-MS/MS وتدل على ان وسائل في كل اجراءات في كالوس في أوراق الأفريكا يحتوي المركبات الثانوية.

# BAB I PENDAHULUAN

## 1.1 Latar Belakang

Tumbuh-tumbuhan mempunyai banyak manfaat bagi kehidupan manusia. Berbagai macam jenis tumbuhan telah dimanfaatkan dalam berbagai aspek kehidupan, antara lain sebagai bahan sandang, pangan, papan, kosmetik, pewarna dan juga obat. Menurut *World Healthy Organization* (WHO), hampir 80% umat manusia, menggantungkan dirinya pada tumbuh-tumbuhan sebagai bahan obat dalam memelihara kesehatannya (Choirul, 2003).

Allah SWT telah menciptakan berbagai macam tumbuhan agar dapat dimanfaatkan oleh manusia. Hal tersebut merupakan rahmat yang diberikan Allah SWT terhadap manusia. Sebagaimana yang terkandung dalam al-Qur'an Surat Thahaa (20):53,

الَّذِي جَعَلَ لَكُمُ الْأَرْضَ مَهْدًا وَسَلَكَ لَكُمْ فِيهَا سُبُلًا وَأَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً

فَأَخْرَجْنَا بِهِ أَزْوَاجًا مِّن نَّبَاتٍ شَتَّى ﴿٥٣﴾

Artinya: “ Yang telah menjadikan bagimu bumi sebagai hamparan dan yang telah menjadikan bagimu itu jalan-jalan, dan menurunkan dari langit air hujan. Maka kami tumbuhkan dengan air hujan itu berjenis-jenis dari tumbuh-tumbuhan yang bermacam-macam”. (QS. Thahaa (20): 53).

Pengertian dari firman Allah **شَتَّى نَبَاتٍ** adalah jenis yang bermacam-macam bentuk, ukuran, manfaat, warna, bau dan rasanya. Kata **نَبَاتٍ** berarti tumbuhan yang bermacam-macam, sedangkan kata **شَتَّى** merupakan bentuk jamak dari kata **شَتِيَّة** yang artinya yang bermacam-macam (Syanqithi, 2007). Kata **شَتَّى** adalah sifat dari kata **أَزْوَاجًا** yang mengandung arti bermacam-macam warnanya, rasanya dan sebagainya. Dan kata **شَتَّى** adalah bentuk jamak dari kata **شَتِيَّة**, seperti kata **مَرِيضٍ** dan **مَرَضَى**. Berasal dari ungkapan **شَتَّ الأَمْرُ** yang berarti bercerai-cerai (Muhammad, 2010).

Tafsir Maraghi (1993) menjelaskan bahwa “Allah SWT menurunkan air hujan dari langit, lalu dengan air hujan itu Allah SWT mengeluarkan berbagai jenis tumbuh-tumbuhan, seperti palawija dan buah-buahan, baik yang masam maupun yang manis. Allah SWT juga mengeluarkannya dengan berbagai manfaat, warna, aroma dan bentuk; sebagiannya cocok untuk manusia dan sebagian lainnya cocok untuk hewan. Disini terdapat penjelasan tentang nikmat-nikmat Allah SWT yang dilimpahkan kepada makhluk-Nya melalui hujan yang melahirkan berbagai manfaat”.

Surat Thahaa ayat 53 ini menjelaskan bahwa Allah SWT menunjukkan kekuasaan dan kemampuan-Nya dalam menciptakan segala sesuatu. Segala macam bentuk ciptaan Allah SWT memiliki manfaat sekaligus nikmat yang besar bagi makhluk hidup. Allah SWT menciptakan berbagai jenis tumbuhan yang bermacam-macam dan dari berbagai jenis tumbuhan itu terdapat manfaat yang terkandung

didalamnya. Tumbuhan memiliki banyak manfaat bagi kehidupan manusia, salah satunya digunakan sebagai obat.

Penggunaan tumbuhan sebagai bahan obat di era modern semakin pesat. Hal ini didorong oleh kemauan untuk kembali ke pengobatan tradisional yang dianggap lebih sedikit efek negatifnya, serta penelitian-penelitian tentang tumbuh-tumbuhan khususnya tumbuhan obat yang kian banyak dilakukan (Aliero, 2009). Oleh karena itu, penelitian ini dianggap perlu dilakukan untuk lebih mendukung penggunaan tumbuhan sebagai bahan obat. Berbagai jenis tumbuhan telah dimanfaatkan sebagai obat oleh manusia, salah satunya adalah daun afrika (*Vernonia amygdalina*).

Daun afrika adalah tanaman dari famili Asteraceae yang berasal dari daerah Afrika termasuk Zimbabwe dan Nigeria yang beriklim tropis, dapat tumbuh secara liar ataupun ditanam di sepanjang Sub-saharan Afrika. Tanaman daun afrika merupakan sayuran yang umum dan populer diantara masyarakat Afrika, karena memiliki banyak manfaat bagi masyarakat Afrika. Daun afrika dapat menghasilkan sejumlah besar makanan ternak, karena sering dimanfaatkan untuk pengganti makanan ayam dan dapat menggantikan sebanyak 300gr/kg makanan dari jagung tanpa mempengaruhi *intake* makanan, berat badan, dan efisiensi makannya (Akpaso *et al.*, 2011).

Daun afrika telah lama digunakan oleh masyarakat sebagai obat tradisional. Aliero (2009) menginformasikan bahwa daun afrika merupakan salah satu tanaman obat yang telah digunakan selama puluhan tahun sebagai obat dan rempah. Peran tanaman ini dalam penggunaannya sebagai obat tradisional dan pemenuhan nutrisi

sangatlah besar dan telah banyak dibuktikan. Dalam penggunaannya untuk kepentingan pengobatan, daun afrika dapat digunakan untuk mengobati berbagai macam penyakit, seperti demam, malaria, diare, disentri, hepatitis, eksema, batuk, hemoroid dan mempertahankan kadar gula darah yang sehat.

Kandungan senyawa kimia dalam daun afrika yang telah ditemukan antara lain, saponin (vernoniosida dan steroid saponin), seskuiterpen lakton (vernolida, vernodalol, vernolepin, vernodalin, dan vernomygdin), flavonoid, kumarin, asam fenolat, lignan, xanton, terpen, peptida, dan luteolin. Daun afrika telah banyak digunakan untuk obat-obatan dan telah banyak penelitian yang telah membuktikan bahwa tumbuhan tersebut memiliki aktivitas sebagai antioksidan, antimutagenik, antikanker antidiabetes (Atangwho *et al.*, 2007) dan analgetik (Njan *et al.*, 2008).

Diantara beberapa kandungan senyawa kimia daun afrika, senyawa yang paling populer adalah senyawa vernodalin yang termasuk golongan seskuiterpen lakton. Hal ini dikarenakan senyawa vernodalin memiliki beberapa aktivitas sebagai antitumor, antikanker dan antibakteri (Njan *et al.*, 2008). Berdasarkan penelitian Nerdy (2015) menunjukkan bahwa beberapa senyawa golongan seskuiterpen seperti vernodalol, vernolepin dan vernodalin memiliki potensi sebagai antimalarial dan antikanker. Kupchan *et al.* (1969) dalam Lifongo *et al.* (2014) melaporkan bahwa vernodalin dapat diisolasi dari daun afrika (*Vernonia amygdalina*), serta memiliki kemampuan melawan aktivitas antitumor.

Melihat besarnya potensi kandungan metabolit sekunder vernodalin pada daun afrika dan semakin meningkatnya penggunaan bahan alam sebagai obat menyebabkan

kebutuhan bahan untuk obat yang berasal dari tumbuhan semakin bertambah dari waktu ke waktu. Lenny (2006) menginformasikan bahwa pada saat sekarang masyarakat luas sudah mulai mengenal dan mengetahui cara pemanfaatan daun afrika, sehingga perlu adanya pengadaan benih maupun bibit yang melimpah untuk pemenuhan pasar. Pengembangan budidaya tanaman daun afrika belum banyak dilakukan oleh peneliti di daerah Asia Tenggara, yang tujuannya untuk meningkatkan kualitas dan kandungan bioaktif (metabolit sekunder) tanaman daun afrika.

Salah satu pengembangan yang mengarah pada budidaya dan perolehan kandungan metabolit sekunder suatu tumbuhan dapat dilakukan dengan kultur jaringan tumbuhan. Fitriani (2003) melaporkan bahwa teknik kultur jaringan tumbuhan atau kultur *in vitro* dapat dijadikan sebagai alternatif pemecahan masalah bagi perbanyakan bibit dan perolehan metabolit sekunder dari suatu tanaman. Yulia *et al.* (2012) menambahkan, melalui teknik kultur jaringan dapat menghasilkan tanaman yang berkualitas.

Senyawa aktif (metabolit sekunder) yang bermanfaat bisa diperoleh melalui kultur kalus. Kultur kalus merupakan salah satu metode kultur jaringan tumbuhan yang paling umum digunakan untuk produksi metabolit sekunder suatu kalus. Menurut Sitorus *et al.* (2011), metabolit yang dihasilkan dari kalus sering kali kadarnya lebih tinggi dari pada metabolit yang diambil langsung dari tanamannya. Hal ini dikarenakan dalam teknik kultur jaringan dapat dilakukan modifikasi media yang sesuai dengan kalus yang akan dikulturkan.

Media dan zat pengatur tumbuh (ZPT) merupakan faktor penentu dalam budidaya dengan menggunakan teknik kultur jaringan. Komposisi media yang digunakan tergantung dengan jenis tanaman yang akan diperbanyak. Media MS (*Murashige dan Skoog*) merupakan media yang paling umum digunakan dalam teknik kultur jaringan tumbuhan. Hal ini dikarenakan media MS mengandung banyak unsur hara makro dan mikro yang dibutuhkan oleh tumbuhan. Marlina dan Rohayati (2009) menyatakan bahwa media MS mempunyai beberapa keunggulan dari pada media yang lain. Salah satu keunggulan media MS yaitu mengandung unsur hara makro dan mikro yang lebih tinggi dibandingkan dengan media yang lain, seperti media B5.

Zat pengatur tumbuh yang sesuai dalam media kultur jaringan tumbuhan sangat diperlukan, karena dapat mempengaruhi pertumbuhan eksplan. Rahayu *et al.* (2009) menyatakan bahwa zat pengatur tumbuh yang digunakan pada medium primer dalam pembentukan kalus sering digunakan berupa sitokinin (BAP, BA, kinetin) dan auksin (2,4-D, IAA, NAA). Suryowinoto (1996) juga menginformasikan bahwa untuk mendapatkan kalus, perlu adanya keseimbangan antara sitokinin dan auksin.

Zat pengatur tumbuh yang digunakan dalam penelitian ini adalah 2 mg/l 2,4-D dan 2 mg/l BAP. Penentuan konsentrasi didasarkan pada hasil penelitian Rosyidah *et al.* (2014), bahwa kombinasi konsentrasi 1 mg/l 2,4-D dan 1 mg/l BAP berpengaruh terhadap waktu induksi kalus daun tanaman melati (*Jasminum sambac*) secara *in vitro*, menghasilkan pertumbuhan kalus yang optimal yaitu waktu induksi kalus pada hari ke-6. Mardini (2015) juga menginformasikan bahwa kombinasi konsentrasi 2,4-D 1,5 mg/l dan BAP 1,5 mg/l merupakan kombinasi konsentrasi yang paling optimal

pada eksplan batang tanaman binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) dengan waktu muncul kalus (5 HST) dan ukuran kalus 8,75 mm. Berdasarkan literatur diatas, diharapkan dengan konsentrasi 2,4-D dan BAP yang seimbang, dapat menghasilkan pertumbuhan kalus yang optimal.

Penemuan zat pengatur tumbuh dan upaya pengembangan formulasi media sangat berperan penting dalam menentukan keberhasilan teknik kultur jaringan tumbuhan. Inti keberhasilan kultur kalus tergantung pada kemampuan manipulasi regenerasi melalui sumber eksplan, lingkungan dan pengaturan komposisi media (Sulistiyati dan Dameria, 2013). Komposisi media memiliki peran yang sangat penting dalam pertumbuhan kalus suatu tanaman. Untuk mencapai keberhasilan kultur kalus, maka pada penelitian ini menggunakan media yang ditambahkan dengan berbagai konsentrasi PEG (*Polyethylen Glycol*). PEG merupakan senyawa yang dapat menimbulkan stres osmosis pada tanaman.

PEG adalah senyawa yang dapat menurunkan potensial osmotik larutan melalui aktivitas matriks sub-unit etilena oksida yang mampu mengikat molekul air dengan ikatan hidrogen. Karena turunnya potensial osmotik larutan, air yang ada pada medium tidak dapat diserap oleh tanaman sehingga tanaman mengalami osmosis yang dicirikan dengan dihasilkannya prolin (Tuasamu, 2009). Salah satu senyawa terlarut yang berperan dalam proses pengaturan tekanan osmotik adalah poliamin (Krasensky dan Jonak, 2012 dalam Kurniawati *et al.*, 2014). Poliamin mempunyai peran yang sangat penting sebagai respon pertahanan tanaman dari cekaman abiotik terutama terkait dengan jalur metabolisme hormon dan sinyal *reactive oxygen species*

(ROS) (Alca'zar *et al.*, 2012). Selain itu, poliamin juga berperan besar pada proses seperti replikasi DNA, transkripsi gen, pembelahan sel, perkembangan organ.

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa penambahan PEG pada media kultur memiliki pengaruh terhadap kualitas (warna dan tekstur) atau kuantitas kalus. Azizah (2010) melaporkan bahwa beberapa konsentrasi PEG 6000 yang ditambahkan ke dalam media memiliki respon yang berbeda-beda dilihat dari morfologi (warna dan tekstur) kalus kedelai. Pada konsentrasi PEG 40 gr/L dan 60 gr/L yaitu warna kalus berwarna kuning coklat dengan tekstur remah, sedangkan pada kontrol dan konsentrasi PEG 20 gr/L kuning dengan tekstur remah. Hasil penelitian Manuhara (2014) menunjukkan bahwa beberapa konsentrasi PEG 6000 memiliki pengaruh terhadap berat basah kalus dari eksplan hipokotil *Helianthus annuus* L. Berat basah tertinggi ditunjukkan pada media dengan konsentrasi PEG 25 mg/l yaitu dengan rerata 0,98 gram.

Media padat yang ditambahkan PEG telah digunakan untuk menciptakan kondisi cekaman kekeringan dengan menurunkan potensial air pada medium pada berbagai percobaan kultur jaringan tumbuhan. Potensial air yang rendah di media dapat menurunkan pembelahan sel dan meningkatkan kandungan metabolit sekunder (Ehsanpour dan Razavizadeh, 2005). Pemberian PEG akan menyebabkan kekurangan air sehingga akan menginduksi protein, mengkode gen-gen pembentuk enzim yang terlibat dalam biosintesis metabolisme sekunder. Dengan meningkatnya kandungan enzim dalam jaringan tanaman maka diharapkan kandungan metabolit sekunder dapat meningkat (Ernawati, 1992).

Penambahan beberapa konsentrasi PEG telah banyak membuktikan dapat menginduksi beberapa metabolit sekunder pada suatu tanaman secara *in vitro*. Seperti penelitian yang telah dilakukan oleh Laila dan Savitri (2014), produksi metabolit sekunder steviosida pada tanaman stevia (*Stevia rebaudiana* Bert. M.) yang tinggi diperoleh dari perlakuan 3 mg/L 2,4-D dan 15 mg/L PEG 6000) yaitu sebesar 4,846 mg/g. Tetapi yang lebih efisien diperoleh pada perlakuan 1 mg/L 2,4-D dan 25 mg/L PEG 6000 yaitu sebesar 4,792 mg/g. Zulhilmi dan Netty (2012) melaporkan bahwa pada uji kualitatif metabolit sekunder pada kalus gatang (*Spilanthes acmella* Murr.), menunjukkan bahwa kandungan alkaloid meningkat dengan penambahan 2% dan 5% PEG dengan kadar sedang, kandungan terpenoid meningkat pada penambahan 3% dan 4% PEG dengan kadar sedang dan senyawa fenolik muncul pada penambahan 4% PEG dengan kadar sedikit.

PEG yang lebih disarankan untuk digunakan adalah PEG dengan berat molekul >4000 karena tidak diserap oleh sel tanaman dan dapat menginduksi cekaman air pada tanaman dengan mengurangi potensial air pada larutan nutrisi tanpa menyebabkan keracunan pada tanaman (Lawyer, 1970 dalam Azizah, 2010). Mexal (1975) dalam Azizah (2010) menambahkan bahwa PEG dengan berat molekul 6000 dipilih karena mampu bekerja lebih baik pada tanaman daripada PEG dengan berat molekul yang lebih rendah.

Berdasarkan beberapa penelitian diatas, maka perlu dilakukan penelitian ini untuk mengetahui bagaimana pengaruh PEG 6000 terhadap kualitas dan kuantitas kalus daun afrika. Konsentrasi PEG 6000 yang digunakan pada penelitian ini adalah 0

mg/l, 5 mg/l, 15 mg/l dan 25 mg/l. Penentuan konsentrasi pada penelitian ini didasarkan pada penelitian Hartanti *et al.* (2013) pada tanaman tembakau (*Nicotiana tabacum* var. *Prancak 95*), yaitu dengan konsentrasi PEG 0 mg/L, 15 mg/L, 20 mg/L, 25 mg/L, dan 30 mg/L. Berdasarkan hasil penelitiannya dapat disimpulkan bahwa konsentrasi PEG yang ditoleransi eksplan untuk membentuk kalus adalah 25 mg/L dengan kalus yang terbentuk berwarna coklat dan tekstur remah.

Penelitian yang dilakukan, selain untuk mengetahui pengaruh PEG terhadap kualitas dan kuantitas kalus, dilakukan pula uji metabolit sekunder vernodalin kalus daun afrika secara kualitatif. Penelitian terdahulu terkait dengan penambahan PEG 6000 pada kultur kalus beberapa tumbuhan sudah banyak dilakukan, namun penelitian terkait dengan penambahan PEG 6000 dalam sintesis metabolit sekunder kalus daun afrika belum pernah dilakukan. Oleh karena itu, dengan penambahan PEG 6000 pada kalus daun afrika ini diharapkan dapat diketahui pengaruhnya terhadap kualitas dan kuantitas kalus serta metabolit sekunder daun afrika.

## 1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Bagaimana pengaruh penambahan berbagai konsentrasi PEG 6000 terhadap kualitas dan kuantitas kalus daun afrika (*Vernonia amygdalina*) secara *in vitro*?
2. Bagaimana uji kualitatif metabolit sekunder vernodalin pada kalus daun afrika (*Vernonia amygdalina*)?

### 1.3 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Untuk mengetahui pengaruh penambahan berbagai konsentrasi PEG 6000 terhadap kualitas dan kuantitas kalus daun afrika (*Vernonia amygdalina*) secara *in vitro*.
2. Untuk mengetahui uji kualitatif metabolit sekunder vernodalin pada kalus daun afrika (*Vernonia amygdalina*).

### 1.4 Hipotesis

Hipotesis dari penelitian ini adalah:

1. Ada pengaruh penambahan berbagai konsentrasi PEG 6000 terhadap kualitas dan kuantitas kalus daun afrika (*Vernonia amygdalina*) secara *in vitro*.
2. Ada pengaruh penambahan berbagai konsentrasi PEG 6000 terhadap metabolit sekunder vernodalin pada kalus daun afrika (*Vernonia amygdalina*).

### 1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah:

1. Penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat untuk pengembangan teknologi dalam kultur jaringan tanaman yang berkaitan dengan kultur kalus daun afrika (*Vernonia amygdalina*).

2. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah mengenai pengaruh penambahan berbagai konsentrasi PEG 6000 terhadap kualitas dan kuantitas kalus daun afrika (*Vernonia amygdalina*).
3. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai uji kualitatif metabolit sekunder vernodalin pada kalus daun afrika (*Vernonia amygdalina*).
4. Penelitian ini diharapkan dapat berguna sebagai bahan acuan untuk penelitian lebih lanjut mengenai uji metabolit sekunder vernodalin secara kuantitatif pada kalus daun afrika (*Vernonia amygdalina*).

#### **1.6 Batasan Masalah**

Batasan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Media yang digunakan adalah media MS (Murashige dan Skoog).
2. Zat pengatur tumbuh (ZPT) menggunakan BAP 2 mg/l dan 2,4-D 2 mg/l.
3. PEG (*Polyethylene Glicol*) 6000 yang digunakan yaitu konsentrasi 0 mg/l, 5 mg/l, 15 mg/l dan 25 mg/l.
4. Parameter yang diamati adalah sifat kualitatif kalus (warna kalus dan tekstur kalus) dan sifat kuantitatif kalus (hari muncul kalus, persentase tumbuh kalus dan berat kalus).
5. Metabolit sekunder yang diuji adalah vernodalin.
6. Pengujian vernodalin secara kualitatif dengan menggunakan LC-MS/MS (*Liquid Chromatograph-tandem Mass Spectrometry*).

## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Daun Afrika (*Vernonia amygdalina*)

#### 2.1.1 Klasifikasi

Daun afrika menurut sistematika taksonomi tumbuhan diklasifikasikan sebagai berikut (Audu *et al.*, 2012):

Kingdom	: Plantae
Division	: Angiosperms
Classes	: Dicotyledons
Order	: Asterales
Family	: Asteraceae
Genus	: Vernonia
Species	: <i>Vernonia amygdalina</i>

#### 2.1.2 Deskripsi dan Morfologi Daun Afrika (*Vernonia amygdalina*)

Tanaman daun afrika (*Vernonia amygdalina*) dalam bahasa Inggris disebut *bitter leaf*, di Malaysia disebut *South Africa leaf*, dan dalam bahasa lokal orang Nigeria disebut sebagai *ewuro* (Yoruba), *etidot* (Efik), *uzi* (Ebira), *onugbu* (Igbo), dan *chusar duki* (Hausa). Sedangkan di Afrika sendiri daun afrika dikenal sebagai *muop* atau *ndole* (Cameroon), *tuntwano* (Tanzania) dan *mululuza* (Uganda) (Audu *et al.*, 2012).

*Vernonia amygdalina* atau yang secara umum disebut dengan *bitter leaf* dan memiliki sinonim *Gymnanthemum amygdalinum* adalah salah satu jenis tanaman atau pohon kecil dari famili Asteraceae dengan ketinggian 2 sampai 5 meter atau bahkan dapat mencapai 10 meter dan memiliki daun yang berwarna hijau dengan bau yang khas dan rasanya yang pahit (Khalafalla *et al.*, 2009). *Vernonia amygdalina* tumbuh di daerah ekologi di Afrika termasuk Zimbabwe dan Nigeria yang beriklim tropis, dapat tumbuh secara liar ataupun ditanam di sepanjang Sub-saharan Afrika (Akpaso *et al.*, 2011)

Daun afrika mempunyai morfologi sebagai berikut; batang tegak, tingginya rata rata 1-3 m dapat mencapai 10 m, lebar kanopi mencapai 40 cm<sup>2</sup>, percabangan banyak, batang bulat, berkayu, berwarna coklat sampai abu abu; daun majemuk, anak daun berhadapan, panjang 15-25 cm, lebar 5-8 cm, tebal 7-10 mm, berbentuk seperti ujung tombak, tepi bergerigi, ujung runcing, pangkal membulat, pertulangan menyirip, berwarna hijau tua; akar tunggang (Ijeh, 2010).

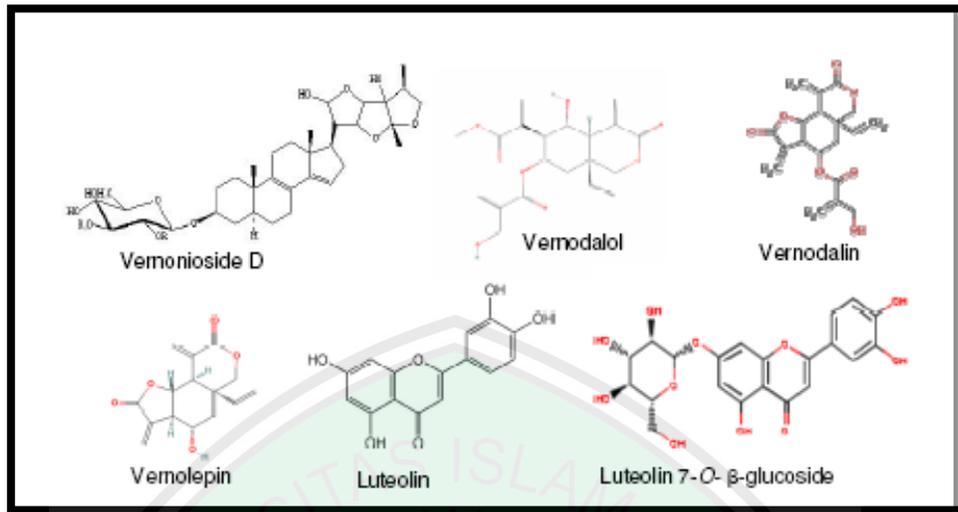


Gambar 2.1 Tanaman Daun Afrika (*Vernonia aygdalina*) (Sumber: Ijeh, 2010)

### 2.1.3 Kandungan Senyawa Bioaktif dan Khasiat Penggunaan

Audu *et.al* (2012) melaporkan bahwa kandungan senyawa bioaktif daun afrika meliputi; *anthraquinone*, *saponin*, *soluble tannin*, *condensed tannin*, *terpenoid*, *glykoside*, *cyanogenic glycoside alkaloid*, *indole alkaloid*, dan *steroidal alkaloid*. Flavonoid juga ditemukan pada tanaman ini dan 3 jenisnya (luteolin, luteolin 7-0-beta-glukuronosid, dan luteolin 7-0-beta glukosid). Atangwho *et al.* (2007) juga melaporkan kandungan senyawa kimia dalam daun afrika yang telah ditemukan antara lain, saponin (vernoniosida dan steroid saponin), seskuiterpen lakton (vernolida, vernodalol, vernolepin, vernodalin, dan vernomygdin), flavonoid, koumarin, asam fenolat, lignan, xanton, terpen, peptida, dan luteolin.

Beragam kandungan fitokimia telah diteliti, komponen senyawa kimia yang telah ditemukan di dalam daun afrika diantaranya; oksalat dan tanin (Eleyinmi *et al.*, 2008). Rasa pahit daun afrika adalah karena memiliki kandungan saponin jenis *vernoniosides*. Selain itu juga terdapat seskuiterpen lakton pada daun afrika. Beberapa seskuiterpen lakton yang diidentifikasi adalah vernolide, vernodalol, vernolepin, vernodalin dan hydroxyvernolide (Erasto *et al.*, 2006). Izevbigie (2003) telah melaporkan kehadiran bioaktif peptida disebut edotides di daun. Prinsip bioaktif ini dapat bertindak sendiri-sendiri, atau sinergis untuk menghasilkan hasil untuk nilai-nilai obat.



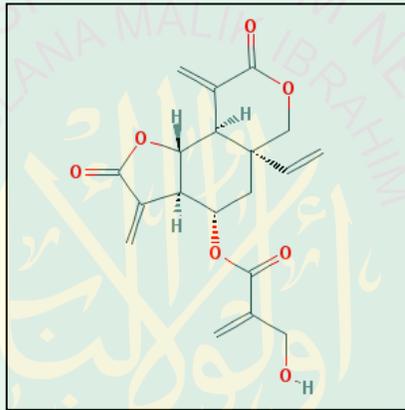
Gambar 2.2 Struktur Beberapa Kandungan Kimia yang Ditemukan di Daun afrika (*Vernonia amygdalina*) (Sumber: Ijeh dan Ejike, 2011)

Dengan banyaknya kandungan-kandungan metabolit pada daun afrika membuat tanaman tersebut terutama dari ekstrak daunnya, dimanfaatkan sebagai medikamen mempunyai aktivitas antimalaria, antimikroba, antifungal, antiprotozoa, laksatif, antitrombotik, antikanker, antidiabetes dan efek hipoglikemia dan hipolipidemia (Asuquo *et al.*, 2010). Kandungan flavonoid, tanin, dan saponin sebagai metabolit sekunder dari ekstrak daun afrika serta *anthraquinone* memiliki aktivitas biologis dan diduga memiliki peran sebagai antibakteri.

#### 2.1.4 Senyawa Vernodalin

Vernodalin adalah senyawa bioaktif dari golongan terpenoid yaitu seskuiterpen lakton. Senyawa ini memiliki banyak manfaat terutama pada bidang pengobatan. Nerdy (2015) melaporkan bahwa hasil identifikasi seskuiterpen lakton

dari daun afrika (*Vernonia amygdalina*) seperti vernodalin memiliki potensi sebagai antimalaria dengan penghambat enzim plasmepsin I dan vernodalin juga berpotensi sebagai antikanker dengan penghambat enzim 17- $\beta$  Hydroxysteroid Dehydrogenase I. Sedangkan Ngatu *et al.* (2010) menyatakan bahwa sehubungan dengan senyawa bioaktif yang paling berperan sebagai antiinflamasi dari daun afrika adalah vernodalin, namun disamping itu terdapat senyawa flavonoid yang paling aktif yaitu *dicaffeoyl-quinic acid*.



Gambar 2.3 Struktur Kimia Vernodalin (Sumber: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound>)

## 2.2 Kultur Jaringan Tanaman (KJT)

### 2.2.1 Definisi Kultur Jaringan Tanaman

Kultur jaringan tanaman (KJT) merupakan metode ilmiah yang digunakan untuk menumbuhkan sel, jaringan atau organ tanaman asal dalam media yang sesuai (George and Jones, 2008). Kultur jaringan atau budidaya *in vitro* merupakan suatu metode untuk mengisolasi bagian dari tanaman seperti protoplasma, sel, jaringan atau organ yang berada dalam kondisi steril, ditumbuhkan pada media pertumbuhan

buatan yang steril, dalam botol kultur yang steril dan dengan teknik penanaman aseptik.

Teori totipotensi sel menjadi dasar dalam pengembangan teknik kultur jaringan tanaman, teori tersebut menyebutkan bahwa setiap sel maupun jaringan dapat berkembang biak dan regenerasi menjadi tanaman lengkap apabila dikulturkan pada media yang sesuai (George, 1993). Berdasarkan teori tersebut, maka sel atau jaringan yang diinokulasikan dalam media akan memiliki kemampuan untuk meregenerasi bagian- bagian tertentu hingga dapat membentuk tumbuhan yang utuh (Wetherell, 1982 dalam Santoso dan Nursandi, 2002).

Kultur jaringan tanaman dapat digunakan untuk menghasilkan tanaman baru dalam jumlah banyak dalam waktu yang relatif singkat (Hendaryono dan Wijayani, 1994). Staba (1980) dalam Santoso dan Nursandi (2002) menyebutkan bahwa dengan kultur jaringan tanaman, faktor lingkungan yang mempengaruhi pertumbuhan tanaman dapat dikendalikan termasuk faktor cahaya, suhu, pH dan nutrisi, organisme pengganggu seperti: jamur, ganggang, bakteri dan serangga dapat dihindari bahkan dihilangkan pengaruhnya, serta produksi metabolit sekunder dapat diatur dengan memanipulasi gen atau perbaikan gen tanaman tersebut.

Teknik kultur jaringan menuntut syarat-syarat tertentu yang harus dipenuhi dalam pelaksanaannya. Syarat pokok pelaksanaan kultur jaringan, adalah laboratorium dengan segala fasilitasnya. Laboratorium harus menyediakan alat-alat kerja, sarana pendukung terciptanya kondisi aseptik terkendali, dan fasilitas dasar seperti air, listrik, dan bahan bakar. Kultur jaringan sangat membantu dalam usaha

eliminasi patogen. Dengan metode ini kita dapat memilih bagian-bagian atau sel-sel yang tidak mengandung patogen, terutama virus, dan menumbuhkan sel-sel tersebut serta meregenerasikannya kembali menjadi tanaman lengkap dan sehat (Gunawan, 1988).

Yuwono (2006) menyebutkan bahwa untuk mengembangkan tanaman secara *in vitro* sampai menjadi planlet dan akhirnya menjadi tanaman lengkap yang siap dipindah ke medium tanah, maka terdapat beberapa tahapan utama yang harus dilakukan, yaitu :

1. Pemilihan sumber tanaman yang akan digunakan sebagai bahan awal (eksplan).
2. Penanaman pada medium yang sesuai sampai terjadi perbanyakan (misalnya dalam bentuk kalus).
3. Pembentukan tunas dan akar sampai terbentuk planlet.
4. Aklimatisasi, yaitu proses adaptasi pada lingkungan diluar sistem *in vitro*.
5. Penanaman pada medium tanah.

### **2.2.2 Faktor-Faktor Yang Mempengaruhi Kultur Jaringan Tumbuhan**

Beberapa faktor yang mempengaruhi kultur jaringan adalah sebagai berikut :

#### **1. Eksplan**

Eksplan merupakan faktor penting penentu keberhasilan dalam kultur jaringan. Umur fisiologis, umur ontogenetik, ukuran eksplan, serta bagian tanaman yang diambil merupakan hal-hal yang harus dipertimbangkan dalam

memilih eksplan yang akan digunakan sebagai bahan awal kultur. Umumnya, bagian tanaman yang digunakan sebagai eksplan adalah jaringan muda yang sedang tumbuh aktif. Jaringan tanaman yang masih muda mempunyai daya regenerasi lebih tinggi, sel-sel masih aktif membelah diri, dan relatif lebih bersih (mengandung lebih sedikit kontaminan) (Yusnita, 2003).

## 2. Media Kultur

Media kultur merupakan salah satu faktor penentu keberhasilan perbanyakan tanaman secara kultur jaringan. Berbagai komposisi media kultur telah diformulasikan untuk mengoptimalkan pertumbuhan dan perkembangan tanaman yang dikulturkan (Yusnita, 2003). Hampir dapat dipastikan bahwa kesuksesan kegiatan kultur jaringan akan sangat ditentukan dan tergantung oleh pilihan media yang digunakan. Harus diingat bahwa teknik kultur jaringan menekankan lingkungan yang cocok agar eksplan dapat tumbuh dan berkembang. Lingkungan yang cocok, sebagian akan terpenuhi bila media yang dipilih mempertimbangkan apa-apa yang diperlukan oleh tanaman (Santoso dan Nursandi, 2002).

Secara umum kebutuhan nutrisi kebanyakan tanaman sama, tetapi secara khusus hal tersebut berbeda. Kesamaannya adalah tanaman memerlukan hara makro dan mikro, vitamin-vitamin, karbohidrat (gula), asam amino dan N-organik, zat pengatur tumbuh, zat pematat dan kadang ada penambahan bahan-bahan seperti air kelapa, ekstrak ragi, jus tomat, ekstrak kentang, buffer organik,

ataupun arang aktif. Kebutuhan tiap tanaman berbeda pada hal komposisi dan jumlah yang diperlukan (Santoso dan Nursandi, 2002).

Media yang umum digunakan dalam kultur jaringan tanaman adalah media *Murashige-Skoog* (MS). Media MS mengandung persenyawaan garam amonium dan nitrat dalam jumlah yang tinggi, keduanya dibutuhkan dalam proses regenerasi. Selain itu, media MS juga banyak mengandung unsur kalium (Dixon, 1985 dalam Santoso dan Nursandi, 2002).

### 3. Zat Pengatur Tumbuh (ZPT)

Zat pengatur tumbuh (ZPT) pada tanaman merupakan senyawa organik yang bukan termasuk unsur hara (nutrisi), yang dalam jumlah sedikit dapat mendukung, menghambat dan dapat merubah proses fisiologis tumbuhan. Zat pengatur tumbuh pada tanaman terdiri dari lima kelompok yaitu auksin, giberelin, sitokinin, etilen dan inhibitor dengan ciri khas dan pengaruh yang berlainan terhadap proses fisiologi (Abidin, 1985). Zat pengatur tumbuh yang digunakan umumnya merupakan hormon tumbuhan atau bentuk sintetikanya. Zat pengatur tumbuh diperlukan dalam proses pertumbuhan dan perkembangan sel tanaman dalam kultur jaringan tanaman sebagai zat tambahan yang berperan sebagai hormon pertumbuhan.

Zat pengatur tumbuh dibutuhkan untuk menginduksi pertumbuhan dan pembelahan sel. Pembentukan kalus dapat dirangsang dengan auksin dan sitokinin. Senyawa auksin misalnya 2,4-diklorofenoksiasetat (2,4-D), asam naftalen asetat (NAA), asam indol asetat (IAA) dan asam indol butirat (IBA).

IAA sangat tidak stabil dan mudah diuraikan oleh enzim yang dibebaskan oleh sel, sedangkan 2,4-D maupun NAA sangat lambat diuraikan oleh tumbuhan dan stabil pada pemanasan dengan autoklaf (Wetherell, 1982).

Pembelahan sel dapat diinduksi dengan senyawa sitokinin, misalnya zeatin, zeatin ribosida, dihidrozeatin dan isopentenil adenin (IPA). Beberapa sitokinin sintetik yang dapat mendorong pembelahan sel yaitu kinetin dan benziladenin (BA). Sejumlah penelitian menunjukkan bahwa sitokinin memacu sitokinesis jaringan yang ditumbuhkan secara *in vitro*. Sitokinin bersama dengan auksin akan menginduksi pembelahan sel yang ditumbuhkan pada media dengan komposisi nutrisi yang optimum (Salisbury dan Ross, 1995 dalam Yusnita, 2003). Perbandingan sitokinin dan auksin yang seimbang akan merangsang pertumbuhan kalus (Yusnita, 2003).

#### 4. Lingkungan

Beberapa faktor lingkungan yang berpengaruh terhadap perkembangan kultur jaringan antara lain pH, kelembaban, cahaya dan temperatur (suhu). Faktor lingkungan tersebut berpengaruh terhadap proses pertumbuhan dan diferensiasi sel. Sel-sel tanaman yang dikembangkan dengan teknik kultur jaringan mempunyai toleransi pH yang relatif sempit, yaitu 5,0-6,0. Bila eksplan mulai tumbuh, pH dalam kultur umumnya akan naik apabila nutrisi habis terpakai. Senyawa fosfat dalam media kultur mempunyai peran yang penting dalam menstabilkan pH. Pengukuran pH dapat dilakukan dengan menggunakan pH meter atau dengan kertas pH (Gunawan, 1995).

pH pada media kultur harus diatur sedemikian rupa sehingga tidak mengganggu fungsi membran sel dan pH dari sitoplasma. Pengaturan pH selain memperhatikan kepentingan fisiologi sel, juga harus mempertimbangkan faktor-faktor kelarutan dari garam-garam penyusun media, pengambilan (*uptake*) dari zat pengatur tumbuh dan garam-garam lain, dan efisiensi pembekuan agar-agar. Sel-sel tanaman membutuhkan pH yang sedikit asam berkisar antara 5.5-5.8. Pengaturan pH, biasa dilakukan dengan menggunakan NaOH (atau kadang-kadang KOH) atau HCl pada waktu semua komponen sudah dicampurkan, seringkali setelah sterilisasi pH-nya berubah. Pada umumnya terdapat penurunan pH setelah disterilkan dalam autoklaf. Untuk mencapai pH sekitar 5,7-5,9, George dan Sherrington (1984) membuat pH 7,0 dalam media yang belum disterilkan.

Cahaya dibutuhkan untuk mengatur proses morfogenetik tertentu. Dalam teknik kultur jaringan tanaman, cahaya dinyatakan dengan dimensi lama penyinaran, intensitas, dan kualitasnya. Prof. Murashige menyarankan untuk mengasumsikan kebutuhan lama penyinaran pada kultur jaringan tanaman merupakan pencerminan dari kebutuhan periodisitas tanaman yang bersangkutan di lapangan. Kualitas cahaya mempengaruhi arah diferensiasi jaringan. Energi radiasi dekat spektrum ultra violet dan biru merupakan kualitas cahaya yang paling efektif untuk merangsang pembentukan tunas, sedangkan pembentukan akar dirangsang oleh cahaya merah dan sedikit cahaya biru. Untuk itu, pada tahap inisiasi dan multiplikasi tunas digunakan pencahayaan dengan lampu fluorescent (TL). Secara umum, intensitas cahaya yang optimum untuk tanaman pada kultur

tahap inisiasi kultur adalah 0-1.000 lux, tahap multiplikasi sebesar 1.000-10.000 lux, tahap pengakaran sebesar 10.000-30.000 lux, dan tahap aklimatisasi sebesar 30.000 lux (Yusnita, 2003).

Suhu juga berpengaruh terhadap kesehatan tanaman yang dikulturkan. Suhu yang umum digunakan untuk pengkulturan berbagai jenis tanaman adalah  $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Untuk kebanyakan tanaman, suhu yang terlalu rendah (kurang dari  $20^{\circ}\text{C}$ ) dapat menghambat pertumbuhan, dan suhu yang terlalu tinggi (lebih dari  $32^{\circ}\text{C}$ ) menyebabkan tanaman merana. Namun, pada kultur tanaman, biasanya memerlukan suhu rendah untuk pertumbuhan terbaiknya (Yusnita, 2003). Gunawan (1995) menyebutkan bahwa beberapa kondisi lingkungan seperti cahaya, suhu dan fase-fase gas mempengaruhi pertumbuhan tanaman dalam kultur jaringan, karena faktor-faktor tersebut diduga berpengaruh pada bagian tanaman dalam mikropropagasi. Mikropropagasi yaitu penggunaan eksplan atau organ tumbuhan untuk tujuan perkecambahan atau pengklonan anak benih menggunakan teknik kultur jaringan.

### **2.2.3 Tipe Kultur Jaringan Tanaman**

Kultur jaringan tanaman terdiri dari berbagai tipe berdasarkan penggunaannya yaitu kultur embrio, kultur meristem, kultur kalus, kultur anter, kultur protoplas. Tipe kultur jaringan tanaman dan penggunaannya disajikan pada tabel 2.1 dibawah ini:

Tabel 2.1 Tipe Kultur Jaringan Tanaman dan Penggunaannya untuk Perbaikan Tanaman (Suliansyah, 2009)

No.	Tipe Kultur Jaringan Tanaman	Penggunaannya
1	Kultur Embrio	Memperpendek siklus pemuliaan dan menghindari inkompatibilitas.
2	Kultur Meristem	Mengeliminasi patogen, mengkloning massal tanaman, mengoleksi plasma nutfah dan kriopreservasi (penyimpanan jangka panjang).
3	Kultur Protoplas	Hibridisasi somatik dan transformasi.
4	Kultur Anter	Menghasilkan homozigot dan menginduksi mutasi.
5	Kultur Kalus	Mengkloning tanaman, menghasilkan varian-varian tanaman, mengeliminasi patogen, sumber protoplas dan memproduksi metabolit sekunder.

Berikut ini adalah uraian mengenai beberapa tipe kultur jaringan tanaman (KJT) (Suliansyah, 2009):

a) Kultur Embrio

Kultur embrio merupakan isolasi dan pertumbuhan aseptik embrio *zigotik matur* dan *immatur* yang bertujuan untuk mendapatkan tanaman yang viabel. Teknik ini telah digunakan untuk sejumlah tanaman dengan berbagai tujuan, antara lain: a)

penyelamatan embrio setelah persilangan intergenerik, b) mempercepat siklus pemuliaan melalui pengkulturan *in vitro* bagi embrio yang lambat berkembang, c) pematangan dormansi bagi biji-biji yang sulit berkecambah, dan d) mendapatkan tanaman yang viabel setelah persilangan sendiri.

#### b) Kultur Meristem

Kultur meristem (atau *mikropropagasi*) merupakan isolasi dan pertumbuhan aseptik ujung tunas (*shoot-tips*) atau meristem secara *in vitro* yang bertujuan untuk mendapatkan *klon-klon* tanaman, tanaman bebas virus, atau untuk konservasi plasmanutfah (*kriopreservasi*). Teknik kultur meristem yang mungkin paling banyak digunakan adalah untuk tujuan memproduksi *klon-klon* secara cepat. Teknik kultur meristem telah digunakan untuk berbagai *species* tanaman, antara lain pisang, kentang, sawit, *eukaliptus*, krisan, dan stroberi. Penggunaan kultur meristem yang tidak kalah penting adalah produksi tanaman bebas virus, seperti pada tanaman kentang, tebu, dan anggrek.

#### c) Kultur Protoplas

Kultur *protoplas* merupakan isolasi steril *protoplas* yang bertujuan untuk memodifikasi genetik sel. Teknik kultur *protoplas* telah digunakan pada sejumlah percobaan, seperti fusi *protoplas* dan injeksi DNA secara langsung (mikroinjeksi dan *microprojectile bombardment*).

#### d) Kultur Anter

Kultur *anter* merupakan isolasi steril *anter* dan perkembangan kultur kalus haploid dari polen secara *in vitro*. Teknik kultur *anter* berguna, antara lain untuk:

produksi haploid untuk memproduksi dengan cepat homozigot dan seleksi bentuk-bentuk mutan.

#### e) Kultur Kalus

Kultur kalus merupakan induksi dan pertumbuhan aspetik kalus secara *in vitro* yang bertujuan untuk mendapatkan tanaman yang baru (diperbaiki sifatnya) atau untuk mendapatkan produk sekunder tanaman. Teknik kultur kalus telah digunakan untuk berbagai tujuan, antara lain: menghasilkan varian genetik yang berguna, penyaringan sel-sel secara *in vitro* bagi tipe-tipe yang memiliki karakter berguna, dan memproduksi produk kimia yang berguna. Salah satu teknik kultur kalus yang umum digunakan adalah untuk memperoleh keragaman somaklonal dan seleksi *in vitro* galur-galur sel terhadap cekaman kekeringan, garam, herbisida, patogen, atau virus.

#### 2.2.4 Kultur Kalus

Kalus adalah suatu kelompok sel yang belum terdiferensiasi (Zulkarnain, 2009). Massa sel ini terbentuk pada seluruh permukaan irisan eksplan sehingga makin luas permukaan irisan eksplan maka semakin cepat dan semakin banyak kalus yang terbentuk (Hendaryono dan Wijayani, 1994). Yuwono (2006) mengatakan bahwa tanaman dapat diperbanyak secara vegetatif menggunakan teknik kultur *in vitro* dengan teknik kultur kalus.

Kultur kalus merupakan salah satu metode dalam kultur jaringan tanaman untuk menumbuhkan dan mengelola massa sel yang tidak beraturan. Tumbuhnya massa sel tersebut akibat pertumbuhan jaringan tanaman yang dilukai menjadi sel

yang terus membelah dan membesar. Kalus dapat diinduksi dengan pelukaan terhadap jaringan tanaman yang kemudian diinokulasikan pada media pertumbuhan yang sesuai. Sel kemudian menjadi aktif membelah dengan adanya rangsangan dari fitohormon maupun zat pengatur tumbuh yang ditambahkan dalam media pertumbuhan. Diferensiasi dan spesialisasi sel yang biasa terjadi dalam tumbuhan dapat terjadi kembali dan eksplan dapat tumbuh menjadi suatu jaringan baru yang tersusun atas sel-sel yang bersifat meristematik (selalu membelah) dan tidak terspesialisasi (George and Jones, 2008).

Kalus dapat diinisiasi dari hampir semua bagian tanaman tetapi organ yang berbeda menunjukkan kecepatan pembelahan sel yang berbeda pula. Jaringan-jaringan yang sedang aktif membelah pada awal masa pertumbuhan biasanya merupakan eksplan yang baik. Bagian tanaman seperti embrio muda, hipokotil, kotiledon, dan batang muda merupakan bagian yang mudah untuk diferensiasi dan menghasilkan kalus (Hartmann *et al.*, 1990).

Kultur kalus dapat dikembangkan dengan menggunakan eksplan yang berasal dari berbagai sumber, misalnya tunas muda, daun, ujung akar, buah, dan bagian bunga. Kalus dihasilkan dari lapisan luar sel-sel korteks pada eksplan melalui pembelahan sel-sel berulang. Kultur kalus tumbuh berkembang lebih lambat dibanding kultur yang berasal dari suspensi sel. Kalus terbentuk melalui tiga tahapan, yaitu induksi, pembelahan sel, dan diferensiasi. Pembentukan kalus ditentukan sumber eksplan, komposisi nutrisi pada medium dan faktor lingkungan. eksplan yang berasal dari jaringan meristem berkembang lebih cepat dibanding jaringan dari sel-sel

berdinding tipis dan mengandung lignin. Untuk memelihara kalus, maka perlu dilakukan subkultur secara berkala, misalnya setiap 30 hari (Andaryani, 2010).

Yuwono (2006) menyebutkan bahwa kultur kalus bermanfaat untuk mempelajari beberapa aspek dalam metabolisme tumbuhan dan diferensiasinya, misalnya mempelajari aspek nutrisi tanaman, diferensiasi dan morfogenesis sel dan organ tanaman, variasi somaklonal, transformasi genetik menggunakan teknik biolistik, produksi metabolit sekunder dan regulasinya. Sedangkan Zulkarnain (2009) mengatakan bahwa tujuan kultur kalus adalah untuk memperoleh kalus dari eksplan yang diisolasi dan ditumbuhkan dalam lingkungan terkendali. Kalus diharapkan dapat memperbanyak dirinya (massa selnya) secara terus menerus. Selain itu, tujuan kultur kalus adalah perbanyak klon tanaman melalui pembentukan organ dan embrio, regenerasi varian-varian genetika, mendapatkan tanaman bebas virus, sebagai sumber untuk produksi protoplas, sebagai bahan awal untuk kreopreservasi, produksi metabolit sekunder dan biotransformasi.

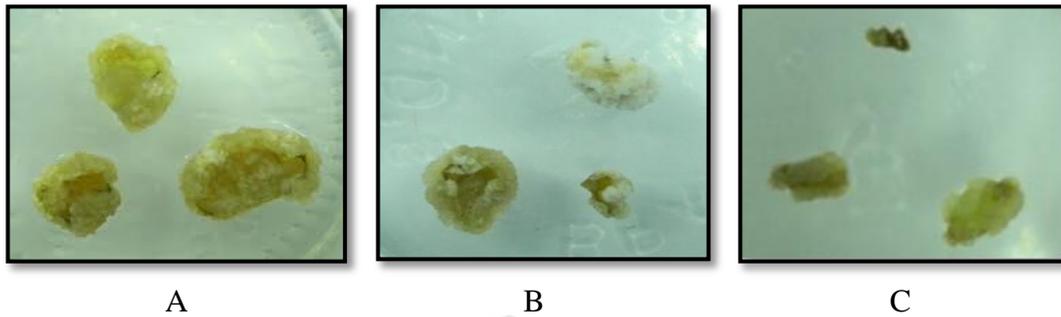
Kualitas pertumbuhan kalus dapat dilihat dari tekstur kalus, warna kalus dan berat kalus. Kebanyakan penelitian tentang kultur kalus menggunakan parameter pengamatan yang meliputi tekstur kalus, warna kalus dan berat kalus untuk menilai pertumbuhan suatu kalus pada tumbuhan. Berikut ini adalah penjelasan tentang tekstur kalus, warna kalus dan berat kalus :

#### **a. Tekstur Kalus**

Tekstur kalus merupakan salah satu penanda yang dipergunakan untuk menilai pertumbuhan suatu kalus. Tekstur kalus dapat dibedakan menjadi tiga macam

yaitu kompak (*non friable*), remah (*friable*) dan intermediet (perpaduan antara kompak dan remah). Kalus kompak yaitu kalus yang terbentuk dari sekumpulan sel yang kuat. Sedangkan kalus yang terdiri dari sel-sel lepas disebut kalus *friable*. Kalus *friable* sangat cocok digunakan untuk pertumbuhan sebagai kalus suspensi. Kalus kompak dapat menjadi kalus remah (*friable*), akan tetapi kalus remah (*friable*) tidak dapat menjadi kalus kompak. Kalus remah dan kalus kompak mempunyai komposisi kimia yang berbeda. Kalus kompak mempunyai kandungan polisakarida dengan pektin dan hemiselulosa. Pektin yang tinggi menjadikan sel lebih kuat dan dapat menahan fragmentasi. Kandungan selulosa yang tinggi meningkatkan sel lebih rigid (Alitalia, 2008).

Turham (2004) menyatakan bahwa secara visual kalus dapat dibedakan menjadi tiga tipe kalus, yaitu kompak, intermediet, dan remah. Kalus memiliki tekstur remah karena mudah memisahkan diri menjadi sel-sel tunggal. Menurut Widayanto (2004) dalam Arianto *et al.* (2013) menyatakan bahwa kalus yang bertipe remah mudah dipisahkan dan jika diambil dengan pinset, kalus akan mudah pecah dan sebagian selnya akan menempel pada pinset. Sebaliknya kalus bertipe kompak mempunyai tekstur yang sulit dipisahkan dan terlihat padat. Menurut Widiarso (2010) dalam Arianto *et al.* (2013), kalus tipe intermediet merupakan massa kalus yang terdiri dari kelompok sel-sel yang sebagian kompak dan sebagian lainnya remah. Berikut ini adalah gambar visualisasi tekstur kalus :



Gambar 2.4 Beberapa Tekstur Kalus Pegagan (*Centella asiatica*), A. Kalus Kompak, B. Kalus Intermediet, C. Kalus Remah (Sumber: Nazza, 2013)

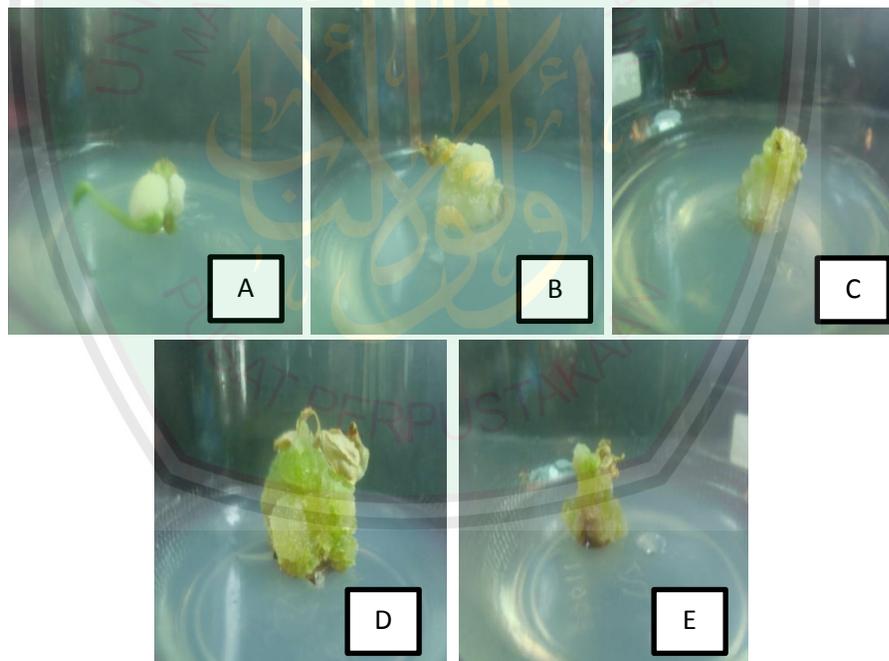
Kalus dengan tekstur kompak atau intermediet merupakan kalus yang dapat menghasilkan metabolit sekunder lebih tinggi dibandingkan kalus dengan tekstur remah. Hal ini terjadi karena produksi senyawa metabolit sekunder terjadi pada saat pertumbuhan kalus mencapai batas optimal (fase stasioner). Sedangkan kalus dengan tekstur remah memiliki masa proliferasi (perbanyakkan dan pertumbuhan) kalus lebih panjang sehingga produksi metabolit sekunder lebih sedikit dibanding kalus yang bertekstur kompak (Lestari, 2013).

#### **b. Warna Kalus**

Kalus dapat berwarna kekuningan, putih, hijau atau terpigmentasi oleh antosianin. Indikator pertumbuhan eksplan pada kultur *in vitro* berupa warna dan tekstur kalus menggambarkan penampilan visual kalus sehingga dapat diketahui kalus yang masih memiliki sel-sel yang aktif membelah atau telah mati. Jaringan kalus yang dihasilkan dari suatu eksplan biasanya memunculkan warna yang berbeda-beda (Indah dan Ermavitalini, 2013). Warna hijau pada kalus adalah akibat efek

konsentrasi sitokinin yang tinggi sehingga mempengaruhi pembentukan klorofil (Riyadi dan Tirtoboma, 2004).

Hendaryono dan Wijayani (1994) menerangkan bahwa kondisi perubahan warna kalus dapat disebabkan oleh adanya pigmentasi, pengaruh cahaya, dan bagian tanaman yang dijadikan sebagai sumber eksplan. Eksplan yang cenderung berwarna kecoklatan disebabkan oleh kondisi eksplan yang secara internal mempunyai kandungan fenol tinggi. Fenol akan teroksidasi menjadi kuinon fenolik oleh pengaruh cahaya. Warna kalus mengindikasikan keberadaan klorofil dalam jaringan, semakin hijau warna kalus semakin banyak pula kandungan klorofilnya (Gambar 2.5).



Gambar 2.5 Kategori skoring warna kalus pada eksplan jarak pagar (A) kalus berwarna putih (B) kalus berwarna hijau keputihan (C) kalus berwarna hijau kekuningan (D) kalus berwarna hijau (E) kalus berwarna hijau kecoklatan (Sumber: Andaryani, 2010)

Warna kecoklatan pada kalus (*browning*) biasanya merupakan akibat adanya metabolisme senyawa fenol bersifat berlebihan, yang sering terangsang akibat proses sterilisasi eksplan (Andaryani, 2010). Peristiwa pencoklatan tersebut sesungguhnya merupakan suatu peristiwa alamiah dan proses perubahan adaptif bagian tanaman akibat adanya pengaruh fisik seperti pengupasan, dan pemotongan. Gejala pencoklatan merupakan tanda-tanda terjadinya kemunduran fisiologis eksplan (Rohmah, 2007).

### **c. Berat Kalus**

Pertumbuhan adalah peningkatan permanen ukuran organisme atau bagian dari tumbuhan yang merupakan hasil dari peningkatan jumlah dan ukuran sel. Pertumbuhan kalus pada media kultur biasanya ditentukan dengan mengukur berat kalus (Yokota *et al.*, 1999). Pertumbuhan kalus sangat penting untuk mengetahui hubungan antara pertumbuhan dan sintesis produk sekunder serta akumulasinya di dalam kalus (Ramawat, 1999). Ruswaningsih (2007), berat segar secara fisiologis terdiri dari dua kandungan yaitu air dan karbohidrat. Berat segar kalus yang besar, disebabkan karena kandungan airnya yang tinggi. Berat basah yang dihasilkan sangat tergantung pada kecepatan sel-sel tersebut membelah diri, memperbanyak diri dan dilanjutkan dengan membesarnya kalus.

Berat kering merupakan parameter pertumbuhan yang dapat digunakan sebagai ukuran global pertumbuhan tanaman dengan segala peristiwa yang dialaminya. Untuk mendapatkan berat kering dilakukan pengeringan untuk menghilangkan kadar air dan menghentikan aktivitas metabolisme dalam bahan hingga

diperoleh berat yang konstan (Muryanti *et al.*, 2005). Menurut Sitompul dan Guritno (1995), bahan kering tanaman dipandang sebagai manifestasi dari semua proses dan peristiwa yang terjadi dalam pertumbuhan tanaman. Produksi tanaman biasanya lebih akurat dinyatakan dengan ukuran berat kering dari pada dengan berat basah, karena berat basah sangat dipengaruhi oleh kondisi kelembaban.

### **2.2.5 Teknik Kultur Kalus Untuk Memproduksi Metabolit Sekunder**

Proses produksi metabolit sekunder secara *in vitro* diawali dengan menumbuhkan eksplan dalam media padat untuk menghasilkan kalus. Kalus adalah massa *amorf* dari sel-sel parenkim berdinding tipis yang tersusun tidak rapat dan tidak teratur, yang berasal dari proliferasi sel eksplan dalam kultur. Sel-sel kalus bersifat meristematis dan merupakan wujud dediferensiasi, yaitu jaringan dewasa yang masih hidup dan telah mempunyai sifat tertentu menjadi meristematis kembali. Menginduksi kalus merupakan salah satu langkah penting dalam kultur *in vitro* (Suryowinoto, 1996).

Kalus memiliki fase pertumbuhan yang ditunjukkan dengan kurva S (sigmoid). Phillips *et al.* (1995) membagi lima fase pertumbuhan kalus, yaitu: 1.) fase lag, dimana sel-sel mulai membelah; 2.) fase eksponensial, dimana laju pembelahan sel berada pada puncaknya; 3.) fase linear, dimana pembelahan sel mengalami perlambatan tetapi laju ekspansi sel meningkat; 4.) fase deselerasi, dimana laju pembelahan dan pemanjangan sel menurun; 5.) fase stationer, dimana jumlah dan ukuran sel tetap. Darwati (2007) mengatakan bahwa metabolit sekunder pada

umumnya meningkat pada fase stasioner. Hal ini dimungkinkan karena adanya peningkatan vakuola sel atau akumulasi. Pada fase stasioner pertumbuhan terhenti dan terjadi kematian sel, hal ini karena sejumlah nutrisi telah berkurang atau terjadi akumulasi senyawa toksik yang dikeluarkan ke dalam medium.

Produksi metabolit sekunder melalui kultur *in vitro* dapat dilakukan dengan kultur kalus maupun kultur suspensi sel. Untuk menghasilkan metabolit sekunder dalam jumlah yang besar melalui kultur *in vitro* dibutuhkan berbagai metode untuk merangsang aktivitas biosintesis senyawa aktif tanaman tersebut (Rao, 2000). Beberapa strategi untuk meningkatkan produksi metabolit sekunder melalui kultur *in vitro* telah dikembangkan. Dalam kultur *in vitro*, jenis metabolit sekunder tertentu akan terakumulasi dalam jumlah yang besar apabila berada di bawah kondisi tertentu pula. Beberapa cara mengoptimalkan produksi metabolit sekunder melalui kultur *in vitro* antara lain: (1) manipulasi faktor lingkungan dan media, (2) pemilihan klon sel yang bernilai tinggi, (3) pemberian prekursor, dan (4) elisitasi (Mulabagal dan Tsay, 2004).

Harahap (2005) menyebutkan bahwa ada 4 keuntungan dalam pemanfaatan teknik kultur jaringan untuk produksi senyawa metabolit sekunder yaitu menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang lebih konsisten dan dalam waktu lebih singkat, faktor lingkungan dapat diatur dan dikendalikan, mutu dari senyawa metabolit sekunder yang diproduksi lebih baik, dan dapat manipulasi pemakaian zat pengatur tumbuh.

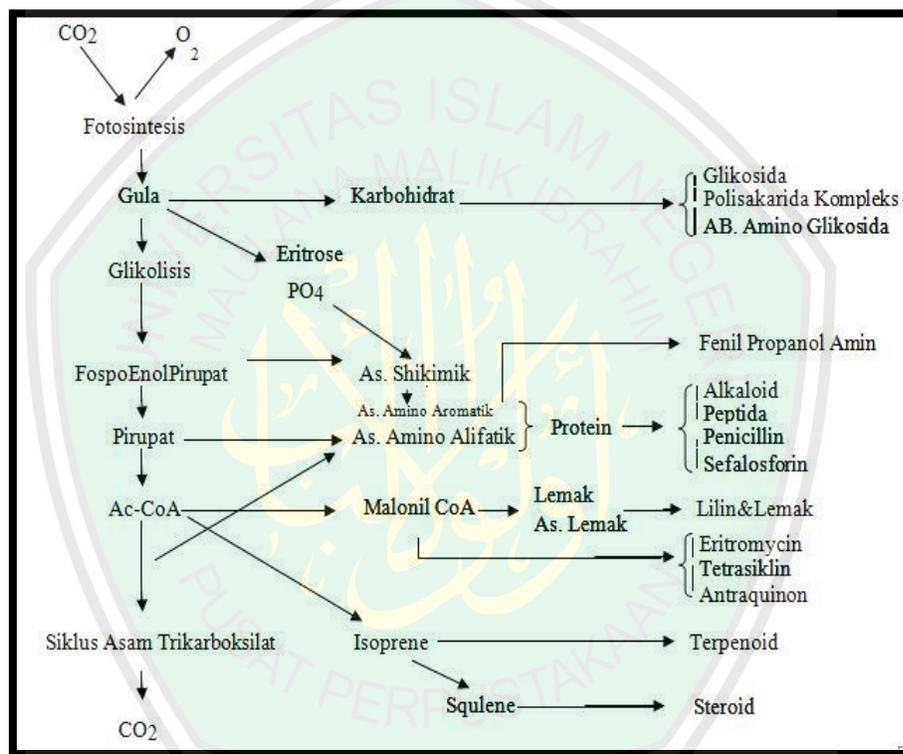
Optimalisasi produk metabolit sekunder dengan memanipulasi kondisi media dan faktor lingkungan dapat dilakukan dengan manipulasi komponen media, fitohormon, pH, suhu, aerasi, elisitasi dan pencahayaan. Manipulasi faktor fisik dan elemen nutrisi kemungkinan menjadi pendekatan yang paling mendasar untuk optimalisasi produksi metabolit sekunder melalui kultur *in vitro* (Mulabagal dan Tsay, 2004). Beberapa produk senyawa ditemukan terakumulasi dalam jumlah yang cukup tinggi dalam kultur, misalnya *ginsenosides* pada *Panax ginseng* (Choi *et al.*, 1997 dalam Lee *et al.*, 2013).

### 2.3 Metabolit Sekunder

Metabolisme pada makhluk hidup dapat dibagi menjadi metabolisme primer dan metabolisme sekunder yang menghasilkan metabolit sekunder. Metabolisme primer pada tumbuhan, seperti respirasi dan fotosintesis, merupakan proses yang esensial bagi kehidupan tumbuhan. Tanpa adanya metabolisme primer, metabolisme sekunder merupakan proses yang tidak esensial bagi kehidupan organisme. Tidak ada atau hilangnya metabolit sekunder tidak menyebabkan kematian secara langsung bagi tumbuhan, tapi dapat menyebabkan berkurangnya ketahanan hidup tumbuhan secara tidak langsung (misalnya dari serangan herbivor dan hama), ketahanan terhadap penyakit, estetika, atau bahkan tidak memberikan efek sama sekali bagi tumbuhan tersebut (Anggarwulan dan Solichatun, 2001).

Pada fase pertumbuhan, tumbuhan utamanya memproduksi metabolit primer, sedangkan metabolit sekunder belum atau hanya sedikit diproduksi. Sedangkan

metabolisme sekunder terjadi pada saat sel yang lebih terspesialisasi (fase stasioner) (Najib, 2006). Metabolit sekunder yang terdapat pada bahan alam merupakan hasil metabolit primer yang mengalami reaksi yang spesifik sehingga menghasilkan senyawa-senyawa tertentu. Berikut ini adalah bagan hubungan biosintesis metabolit primer menjadi metabolit sekunder (Gambar 2.6):



Gambar 2.6 Bagan Hubungan Biosintesis Metabolit Primer Menjadi Metabolit Sekunder (Sumber: Sastrohamidjojo, 1996).

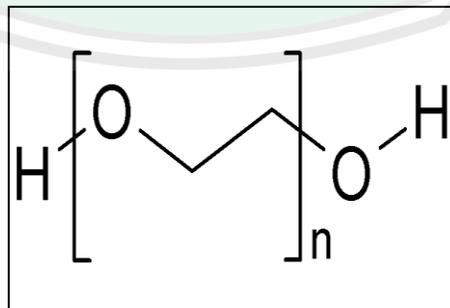
Metabolit sekunder disebut juga dengan fitoaleksin. Fitoaleksin didefinisikan sebagai senyawa kimia yang mempunyai berat molekul rendah dan memiliki sifat antimikroba atau antiparasit. Senyawa ini diproduksi oleh tanaman pada waktu

mengalami infeksi atau cekaman (*stress*) lingkungan. Fitoaleksin merupakan senyawa kimia yang berasal dari derivat flavonoid dan isoflavon, turunan sederhana dari fenilpropanoid, dan derivat dari sesquiterpens. Fitoaleksin berasal dari biosintesis metabolit primer yaitu seperti 6-methoxymellein dan sesquiterpens serta derivat dari asam melonat dan asam mevalonat. Fitoaleksin dapat terjadi dari dua jalur yaitu jalur asam mevalonat dan jalur biosintesa deoksiselulosa difosfat. Biosintesis fitoaleksin menggunakan prekursor yang berasal dari jalur metabolit sekunder (Hammerschmidt, 1999 dalam Simanjuntak, 2002).

## 2.4. PEG (Polietilen Glikol)

### 2.4.1 Definisi PEG

Polietilen glikol (PEG) disebut juga makrogol, merupakan polimer sintetik dari oksietilen dengan rumus struktur  $\text{HO-CH}_2 - (\text{CH}_2\text{-O-CH}_2)_n\text{-CH}_2\text{-OH}$  (Perdana, 2010). PEG umumnya memiliki bobot molekul antara 200–300000. Penamaan PEG umumnya ditentukan dengan bilangan yang menunjukkan bobot molekul rata-rata (Leuner and Dressman, 2000).



2.7 Struktur PEG (Sumber: Leuner and Dressman, 2000)

Kepadatannya sangat dipengaruhi oleh bobot molekul. PEG dengan bobot molekul 200-600 (PEG 200-600) berbentuk cair, PEG 1500 berbentuk semi padat, dan PEG 3000-20000 berbentuk padatan semi kristalin, dan PEG dengan bobot molekul lebih besar dari 100000 berbentuk seperti resin pada suhu kamar. Umumnya PEG dengan bobot molekul 1500-20000 yang digunakan untuk dispersi padat. PEG 6000 merupakan serpihan wax berbentuk padat, berwarna putih, dan serbuk yang mudah mengalir. Suhu lebur pada PEG 6000 adalah 7000-9000. Kelarutan semua tingkat dari PEG larut dalam air, bercampur dengan PEG lainnya, larut dalam aseton, diklorometan, etanol dan metanol, agak sukar larut dalam hidrokarbon alifatik dan eter, tidak larut dalam lemak, campuran minyak dan minyak mineral. Polimer ini mudah larut dalam berbagai pelarut, titik leleh dan toksisitasnya rendah, berada dalam bentuk semi kristalin. Kebanyakan PEG yang digunakan memiliki bobot molekul antara 4000-20000, khususnya PEG 4000 dan PEG 6000 (Leuner and Dressman, 2000).

Senyawa polietilena glikol (PEG) merupakan senyawa yang dapat menurunkan potensial osmotik larutan melalui aktivitas matriks sub-unit etilena oksida yang mampu mengikat molekul air dengan ikatan hidrogen. Penyiraman larutan PEG ke dalam media tanam diharapkan dapat menciptakan kondisi cekaman karena ketersediaan air bagi tanaman menjadi berkurang. Ukuran molekul dan konsentrasi PEG dalam larutan menentukan besarnya potensial osmotik larutan yang terjadi (Widoretno, 2003). Menurut Michel dan Kaufmann (1973), larutan PEG 6000

dengan konsentrasi 5% mempunyai potensial osmotik  $-0,13$  MPa (1,26 bar) sedangkan konsentrasi 20% mempunyai potensial osmotik  $-0,71$  MPa (7,06 bar).

Widoretno (2003) melaporkan bahwa kalus yang diseleksi dengan PEG (0-20%) menunjukkan semakin tinggi konsentrasi PEG yang diberikan maka semakin sedikit pula jumlah struktur embrio somatik yang diperoleh. Hal ini terjadi karena pada media seleksi kekurangan atau bahkan tidak memperoleh air karena air terikat oleh PEG(>30%) dan tidak dapat dimanfaatkan oleh eksplan. Sulitnya air masuk ke dalam sel makin besar dengan meningkatnya konsentrasi PEG. Menurut Ehsanpour dan Razavizadeh (2005), media padat yang ditambahkan PEG telah digunakan untuk menciptakan kondisi cekaman kekeringan dengan menurunkan potensial air pada medium pada berbagai percobaan kultur jaringan. Potensial air yang rendah di medium dapat meningkatkan kandungan metabolit sekunder.

#### **2.4.2 Peran PEG dalam Menginduksi Metabolit Sekunder**

Cekaman oksidatif telah diketahui mengubah jalur metabolisme normal di jaringan sehat dengan cara memicu rentetan proses degeneratif. Kerusakan yang diakibatkan oleh  $O_2$  dan radikalnya disebut cekaman oksidatif. Beragam cekaman baik biotik (Hammond-Kosack and Jones, 1996) ataupun abiotik meningkatkan aktivitas enzim pencarian  $O_2$ . Stimulasi PEG (*Polyethylene glycol*) salah satu contoh cekaman abiotik. Beberapa ROS seperti hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ), superoksida ( $O_2^-$ ), radikal hidroksil ( $OH^\cdot$ ), dan oksigen tunggal ( $O_2^+$ ) berperan sebagai molekul

pembawa pesan pada berbagai macam keadaan biotik dan suatu cekaman-cekaman biotik (Levine *et al.*, 1994 dalam Astuti 2008).

Adanya stress yang disebabkan oleh lingkungan eksternal tanaman menyebabkan terjadinya mekanisme pertahanan tanaman salah satunya dengan pembentukan metabolit sekunder (Muryanti dan Anggarwulan, 2005). Tanaman secara alami akan memberikan respon terhadap patogen, serangga dan herbivora ataupun cekaman biotik dan abiotik (stres) dengan mekanisme perlindungan termasuk pembentukan metabolit sekunder seperti fitoaleksin, respon hipersensitif dan pertahanan struktural (Vasconsuelo dan Boland, 2007 dalam Muryanti dan Anggarwulan, 2005). PEG akan menyebabkan kekurangan air sehingga akan menginduksi gen-gen tertentu untuk membentuk protein pembentuk enzim yang terlibat dalam biosintesis metabolisme sekunder. Dengan meningkatnya kandungan enzim dalam jaringan tanaman maka diharapkan kandungan metabolit sekunder dapat meningkat (Ernawati, 1992).

Beberapa penelitian telah membuktikan bahwa penambahan PEG dapat meningkatkan metabolit sekunder suatu tanaman. Penelitian yang dilakukan oleh Yulinda (2010) dalam Laila dan Savitri (2014) melaporkan bahwa kandungan metabolit sekunder triterpenoid pada tanaman *Centella asiatica* meningkat dengan penambahan 1 dan 2% PEG. Sedangkan penelitian Fakhri (2010) pada tanaman *Theobroma cacao* menunjukkan kandungan metabolit sekunder katekin terbanyak dihasilkan pada penambahan PEG 1%.

## 2.5 LC-MS/MS (*Liquid Chromatograph-tandem Mass Spectrometry*)

LC-MS/MS adalah salah satu teknik kimia yang menggabungkan kemampuan pemisahan fisik dari kromatografi cair dengan kemampuan analisis spectrometer massa. LC-MS/MS merupakan satu satunya teknik kromatografi cair dengan detektor spectrometer massa. Kelebihan dari teknologi LC-MS/MS meliputi (Michael dan Seger, 2008 dalam Ginting, 2012):

1. Spesifitas. Hasil analisis yang khas dan spesifik diperoleh dari penggunaan spectrometer massa sebagai detektor.
2. Aplikasi yang luas dengan sistem yang praktis. Penerapan LC-MS/MS tidak terbatas untuk molekul volatil (biasanya dengan berat molekul dibawah 500 Da). Mampu mengukur analit yang sangat polar, selain itu persiapan sampel cukup sederhana tanpa adanya teknik derivatisasi.
3. Fleksibilitas. Pengujian yang berbeda dapat dikembangkan dengan tingkat fleksibilitas yang tinggi dan waktu yang singkat.
4. Kaya Informasi. Sejumlah data kualitatif maupun kuantitatif dapat diperoleh. Hal ini disebabkan seleksi ion yang sangat cepat dengan banyak parameter.

Spektrometer massa bekerja dengan molekul pengion yang kemudian akan memilah dan mengidentifikasi ion menurut massa, sesuai rasio fragmentasi molekul ( $m/z$ ). Dua komponen kunci dalam proses ini adalah sumber ion (*ion source*) yang akan menghasilkan ion, dan analisis massa (*mass analyzer*) yang menyeleksi ion. Sistem LC-MS/MS umumnya menggunakan beberapa jenis ion source dan mass

analyzer yang dapat disesuaikan dengan kepolaran senyawa yang akan dianalisa (Agilent Technologies, 2001 dalam Ginting, 2012).

Berikut ini adalah tabel ringkasan senyawa yang diidentifikasi menggunakan MS, MS/MS dan UV-spectra (Looi et al., 2013);

Tabel 2.2 Ringkasan Senyawa yang Diidentifikasi Menggunakan MS, MS/MS dan UV-spectra

Rt (min)	MW	[M+H] <sup>+</sup> or [M-H] <sup>-</sup>	+/- Ions	MS/MS fragment	Tentative identifications
2.3	378	377	-	257, 257, 230, 187	Unknown
3.0	360	361	+	259, 247, 86, 58	Vernodaline
3.6	330	329	-	229, 211, 99, 83	Vernudiflorid

Keterangan: RT (Retention Time), MW (Molecular Weight), [M+H]<sup>+</sup> or [M-H]<sup>-</sup> (protonated and deprotonated molecules).

## **BAB III METODE PENELITIAN**

### **3.1 Rancangan Penelitian**

Penelitian ini termasuk penelitian eksperimental. Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 4 perlakuan dan 5 ulangan. Perlakuan pada penelitian ini menggunakan beberapa konsentrasi PEG (*Polyethylen Glycol*) 6000 yang berbeda yaitu 0 mg/l, 5 mg/l, 15 mg/l dan 25 mg/l.

### **3.2 Tempat dan Waktu**

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan Tumbuhan Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang dan Laboratorium Jurusan Teknik Kimia Politeknik Negeri Malang, dimulai pada bulan Juli sampai Oktober 2015.

### **3.3 Alat dan Bahan**

#### **3.3.1 Alat**

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah LAF (*Laminar Air Flow*), autoklaf, kompor, panci, batang pengaduk, timbangan analitik, pH meter, oven, pipet, botol kultur, cawan petri, erlenmeyer, *beaker glass*, alat-alat diseksi (gunting pinset, *scalpel* dan mata pisau), gelas ukur, lemari pendingin, *hot plate and magnetic stirrer*, penyemprot alkohol, lampu bunsen, aluminium foil, karet, plastik wrap, plastik tahan panas, kertas label, kertas tisu, rak kultur, AC (*Air Conditioner*) dan LC-MS/MS (*Liquid Chromatograph-tandem Mass Spectrometry*).

### 3.3.2 Bahan

Bahan utama yang digunakan adalah daun afrika yang masih muda. Bahan untuk sterilisasi adalah alkohol 70%, alkohol 96 %, NaOCl dan aquades steril. Bahan media yang digunakan adalah media MS (*Murashige and Skoog*), gula, agar-agar, BAP 2 mg/l , 2,4-D 2mg/l dan PEG 6000 (0 mg/l, 5 mg/l, 15 mg/l, 25 mg/l).

## 3.4 Prosedur Penelitian

### 3.4.1 Sterilisasi Alat

Sterilisasi alat adalah dilakukan dengan mencuci alat-alat diseksi (*scalpel*, gunting, pinset) dan alat-alat gelas (botol kultur, cawan petri dan lain-lain) menggunakan deterjen cair dan dibilas hingga bersih. Alat-alat yang selesai dicuci, dikeringkan dengan oven selama 2 jam dengan suhu 120°C. Alat-alat diseksi dibungkus dengan alumunium foil, cawan petri dibungkus dengan kertas bekas kemudian dimasukkan dalam plastik tahan panas, sedangkan botol kultur ditutup dengan plastik. Setelah itu disterilkan menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C selama 20 menit.

### 3.4.2 Pembuatan Larutan Stok ZPT

Pembuatan larutan stok BAP 100 ppm dan 2,4-D 100 ppm dilakukan dengan cara melakukan penimbangan 10 mg BAP dan 10 mg 2,4-D, kemudian dilarutkan kedalam masing-masing aquades 100 ml sehingga diperoleh konsentrasi ZPT BAP 100 ppm dan 2,4-D 100 ppm. Selanjutnya larutan stok dimasukkan kedalam botol dan disimpan dalam lemari pendingin.

### 3.4.3 Pembuatan Larutan Stok PEG

Larutan stok PEG 100 ppm dibuat dengan cara menimbang 10 mg serbuk PEG dan dilarutkan dalam aquades 100 ml. Kemudian dihomogenkan menggunakan *stirrer*. Untuk mengambil 5 mg/L (5 ppm) dilakukan pengenceran dengan rumus pengenceran  $V_1M_1 = V_2M_2$  yaitu sebanyak 50 ml dalam larutan stok, 15 mg/L (15 ppm) diambil sebanyak 150 ml dalam larutan stok, dan 25 mg/L (25 ppm) diambil sebanyak 250 ml dalam larutan stok.

### 3.4.4 Pembuatan Media Perlakuan

Pembuatan media perlakuan sebanyak 1 liter dilakukan dengan cara menimbang media MS sebanyak 4,43 gr, gula sebanyak 30 gr dan dimasukkan kedalam masing-masing *beaker glass* yang telah berisi aquades. Ditambahkan PEG berbagai konsentrasi (0 mg/l, 5 mg/l, 15 mg/l, 25 mg/l) dan ZPT (2 ppm BAP dan 2 ppm 2,4-D) kedalam *beaker glass*. Dihomogenkan dan diukur pH larutan media dengan pH meter, yaitu 5,6-5,8. Penurunan dan peningkatan pH dilakukan dengan menambahkan beberapa tetes HCl 0,10 N dan NaOH 0,10 N. Ditimbang agar-agar sebanyak 7 gr dan ditambahkan dalam masing-masing *beaker glass* yang berisi aquades, media MS, gula, beberapa konsentrasi PEG 6000 dan ZPT. Kemudian media dipanaskan diatas kompor dan diaduk hingga mendidih. Setelah mendidih, media dituang ke dalam botol kultur, kemudian ditutup dengan pastik dan diikat dengan karet serta di beri kertas label.

### 3.4.5 Sterilisasi Media

Media dalam botol kultur disterilisasi dengan autoklaf pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$ , tekanan  $1,5 \text{ kg/cm}^2$  selama 45 menit. Setelah itu, botol-botol ditempatkan pada rak-rak kultur di ruang inkubasi.

### 3.4.6 Sterilisasi Ruang Tanam

Sterilisasi ruang tanam dilakukan dengan cara mengepel lantai ruang inisiasi hingga bersih. Kemudian kapas yang telah diberi formalin diletakkan dipojok-pojok ruangan. Selanjutnya meja LAF (*Laminar Air Flow*) dibersihkan dengan alkohol 70% dan dinyalakan sinar UV selama 1 x 24 jam. Setelah 1 x 24 jam, sinar UV dimatikan dan menyalakan blower selama 15 menit. Sebelum melakukan inisiasi, meja LAF dibersihkan lagi dengan alkohol 70%.

### 3.4.7 Tahap Perlakuan

#### 3.4.7.1 Sterilisasi Eksplan

Eksplan diambil dari daun muda tanaman daun afrika menggunakan gunting, kemudian dicuci menggunakan detergen dan dibilas dengan air mengalir sampai bersih. Kemudian eksplan di rendam dalam larutan fungisida selama 10 menit dan dicuci bersih pada air mengalir. Kemudian eksplan direndam didalam larutan HgCl 30% dan 20% selama 3 menit kemudian dibilas dengan aquades steril sebanyak 3 kali. Selanjutnya eksplan direndam lagi pada alkohol 70% selama 1 menit dan dibilas dengan aquades steril.

### 3.4.7.2 Inisiasi Eksplan

Eksplan yang telah disterilisasi diletakkan pada cawan petri, kemudian dipotong-potong dengan ukuran 0,5 cm dan ditanam dalam media perlakuan dengan masing-masing konsentrasi PEG yang berbeda yaitu pada konsentrasi 0 mg/L, 5 mg/L, 15 mg/L, dan 25 mg/L . Eksplan yang telah ditanam dalam botol kultur di tata pada rak-rak kultur. Selanjutnya eksplan diinkubasi dalam ruang kultur pada suhu  $\pm$  28°C selama 6 minggu.

### 3.4.8 Tahap Pengamatan

Pengamatan dilakukan pada minggu ke-6 setelah dilakukannya induksi kalus pada media perlakuan, dengan tujuan untuk mengetahui kualitas kalus dan kuantitas kalus. Untuk parameter pemangatannya adalah sebagai berikut :

1. Pengamatan warna kalus dan tekstur kalus dilakukan dengan cara mengamati perubahan warna dan tekstur pada setiap kalus, dan dilakukan pada akhir pengamatan. Pengamatan pada tekstur kalus dapat diamati secara visual yaitu dengan melihat kalus yang remah atau *friable*, kalus kompak, atau kalus intermediet.
2. Pengamatan hari muncul kalus, persentase tumbuh kalus dan berat kalus dilakukan pada akhir pengamatan. Hari muncul kalus dilihat pada hari keberapa awal munculnya kalus.

3. Persentase tumbuh kalus dihitung menggunakan rumus berikut ini;

$$\frac{\Sigma \text{ kalus yang terbentuk}}{\Sigma \text{ ekplan yang ditanam}} \times 100\%.$$
 Sedangkan berat kalus dihitung dengan

menimbang berat basah kalus pada akhir pengamatan.

4. Pengamatan metabolit sekunder vernodalin secara kualitatif menggunakan teknik LC-MS/MS (*Liquid Chromatograph-tandem Mass Spectrometry*).

### **3.4.9 Tahap Uji Kualitatif Metabolit Sekunder**

Pengujian metabolit sekunder vernodalin secara kualitatif dilakukan di Laboratorium Jurusan Teknik Kimia Politeknik Negeri Malang dengan menggunakan LC-MS/MS yaitu dengan cara mengekstrak kalus, kemudian diuji menggunakan alat LC-MS/MS.

#### **3.4.9.1 Ekstraksi Kalus**

Ekstraksi kalus dilakukan dengan tujuan, sampel akan diuji produksi metabolit sekundernya secara kualitatif menggunakan LC-MS/MS. Langkah ekstraksi kalus pada penelitian ini adalah; kalus dimasukkan kedalam tabung, ditambahkan chloroform sebanyak 5 ml dan disonifikasi selama 30 menit. Setelah itu disaring, diambil cairan chloroform dan dikeringkan pada suhu 50 °C. Selanjutnya ditambahkan methanol (20 µMol) ammonium format dan dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 5 menit. Cairan difiltrasi menggunakan mikro filter 0,2 µm.

### 3.4.9.2 Analisis LC-MS/MS

Analisis vernodalin dilakukan dengan mengambil cairan hasil akhir ekstraksi kalus. Cairan yang telah siap dimasukkan kedalam autosampler dan dilarutkan dalam 1 ml MeOH, disaring melalui 0,45 mm penyaring dan mengalami kromatografi cair kinerja tinggi (HPLC). Elusi gradien dilakukan dengan menggunakan linear gradien sistem pelarut yang terdiri dari pelarut A (air dengan 0,1% asam format) dan pelarut (B) (asetonitril dengan 0,1% asam format). Temperatur kolom dipertahankan pada 40 °C dan volume injeksi adalah 2 ml. Pemisahan senyawa dipantau dengan DAD di 254 dan 190 nm dan dengan detektor spektrometri massa. Analisis spektrometri massa (ESI) dilakukan pada LCMS-8030 spektrometer massa triple quadrupole. LC-MS/MS didirikan di negatif dan modus ionisasi positif dengan spektrum yang diperoleh selama kisaran massa 50-1000 m/z (Looi *et al.*, 2013)

### 3.5 Analisis Data

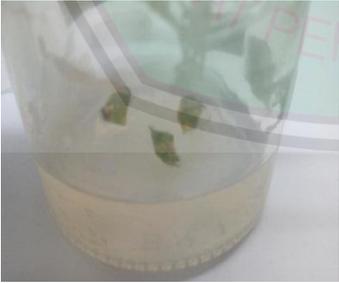
Data pengamatan berupa data kualitatif dan kuantitatif. Data kualitatif berupa pengamatan secara visual meliputi warna kalus dan tekstur kalus, sedangkan data kuantitatif berupa hari muncul kalus, persentase tumbuh kalus dan berat kalus. Data kualitatif dianalisis dengan menggunakan analisis secara deskriptif. Sedangkan data kuantitatif dianalisis menggunakan uji statistik *One Way ANOVA*. Bila terdapat perbedaan nyata maka dilakukan uji DMRT pada taraf 5%.

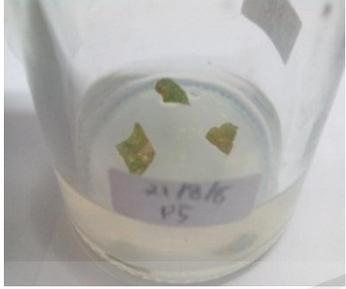
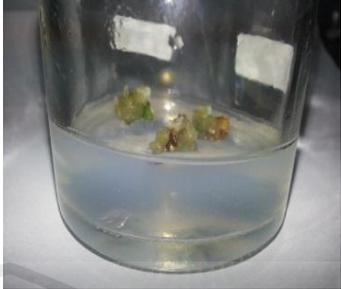
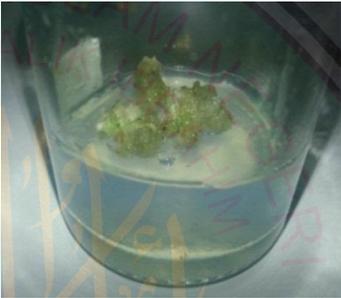
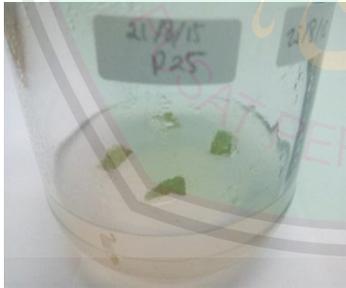
**BAB IV**  
**HASIL DAN PEMBAHASAN**

**4.1 Pengaruh Konsentrasi PEG 6000 terhadap Kualitas Kalus (Warna dan Tekstur) Daun Afrika (*Vernonia amygdalina*)**

Penambahan beberapa konsentrasi PEG 6000 pada suatu media memberikan pengaruh yang berbeda-beda terhadap kualitas dan kuantitas suatu kalus. Penelitian ini menunjukkan bahwa beberapa konsentrasi PEG 6000 tidak memiliki pengaruh yang nyata terhadap warna kalus dan tekstur kalus daun afrika. Hasil pengamatan warna dan tekstur kalus diamati pada akhir pengamatan yaitu 6 MST (minggu setelah tanam) karena pada minggu tersebut kalus telah mengalami fase-fase pertumbuhan. Hasil penelitian ini dapat dilihat pada tabel dibawah ini:

Tabel 4.1 Gambar Pengamatan Kalus Daun Afrika

Perlak.	Gambar		Warna	Tekstur
	Awal pengamatan	Akhir pengamatan	Kalus	Kalus
PEG 0			Hijau kecoklatan	Remah

PEG 5			Hijau keputihan	Intermediet
PEG 15			Hijau keputihan	Intermediet
PEG 25			Hijau kecoklatan	Remah

#### 4.1.1 Pengaruh PEG 6000 terhadap Warna Kalus Daun Afrika (*Vernonia amygdalina*)

Warna kalus merupakan salah satu indikator pertumbuhan eksplan pada budidaya *in vitro* yang menggambarkan penampilan visual kalus sehingga dapat diketahui apakah suatu kalus masih memiliki sel-sel yang aktif membelah atau telah mati. Jaringan kalus yang dihasilkan dari suatu eksplan biasanya memunculkan warna yang berbeda-beda (Indah dan Ermavitalini, 2013). Pada penelitian ini menunjukkan bahwa beberapa konsentrasi PEG 6000 yang ditambahkan pada media, pengaruhnya terhadap warna kalus daun afrika (*Vernonia amygdalina*) tidak terlihat signifikan.

Berdasarkan pengamatan yang dilakukan pada 3 MST (minggu setelah tanam), menunjukkan bahwa warna kalus pada semua perlakuan adalah hijau. Namun terjadi perubahan warna pada akhir pengamatan (6 MST) yaitu warna kalus menjadi hijau keputihan pada media dengan konsentrasi PEG 5 mg/l dan 15 mg/l, sedangkan pada konsentrasi PEG 0 mg/l dan PEG 25 mg/l warna kalus menjadi hijau kecoklatan. Perubahan warna kalus menjadi kecoklatan menunjukkan terjadinya senyawa fenolik. Fenol yang teroksidasi akan membentuk kuinon dan kuinon adalah senyawa yang menyebabkan warna coklat pada kultur kalus. Intensitas warna coklat berkorelasi positif dengan hiperaktivitas enzim oksidatif. Peningkatan enzim tersebut terkait dengan reaksi pertahanan jaringan dari stres oksidatif (Naz, 2008 dalam Laila dan Savitri, 2014).

Menurut Robbiani (2010) dalam Nazza (2013), kalus yang berwarna putih tidak mengandung kloroplas, tetapi mengandung plastid yang berisi butir pati yang

sedikit-demi sedikit tumbuh menjadi sistem membran yang jelas yang akhirnya terbentuklah butir-butir klorofil dengan paparan cahaya, sehingga kalus menjadi berwarna hijau. Sedangkan pencoklatan adalah peristiwa alamiah, yang merupakan suatu proses perubahan adaptif bagian tanaman akibat adanya pengaruh seperti respon dari bekas perlakuan pada eksplan dan juga merupakan tahapan awal perubahan warna kalus menjadi putih kehijauan. Perubahan warna juga karena adanya sintesis senyawa fenolik akibat adanya cekaman berupa perlakuan pada jaringan.

Menurut Fatmawati (2008) dalam Lizawati (2012), warna kalus mengindikasikan keberadaan klorofil dalam jaringan, semakin hijau warna kalus semakin banyak pula kandungan klorofilnya. Menurut Hendaryono dan Wijayani (1994) dalam Lizawati (2012) menginformasikan bahwa kondisi perubahan warna kalus dapat disebabkan oleh adanya pigmentasi, pengaruh cahaya, dan bagian tanaman yang dijadikan sebagai sumber eksplan.

#### **4.1.2 Pengaruh PEG 6000 terhadap Tekstur Kalus Daun Afrika (*Vernonia amygdalina*)**

Tekstur kalus merupakan salah satu parameter pengamatan yang dilakukan pada penelitian ini. Pengamatan tekstur dilakukan pada akhir pengamatan bersamaan dengan pengamatan warna kalus. Tujuan dilakukannya pengamatan tekstur kalus pada penelitian ini adalah untuk mengetahui apakah ada perbedaan tekstur kalus pada media perlakuan. Berdasarkan pengamatan penambahan berbagai konsentrasi PEG

6000 pada media perlakuan tidak terdapat pengaruh yang nyata terhadap tekstur kalus daun afrika.

Hasil pengamatan pada penelitian ini menunjukkan bahwa penambahan konsentrasi PEG 6000 tidak memiliki pengaruh yang nyata terhadap tekstur kalus. Tekstur kalus yang terbentuk pada media PEG 0 mg/l dan PEG 25 mg/l adalah remah, sedangkan pada media PEG 5 mg/l dan 15 mg/l tekstur kalus intermediet. Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Adri (2012), menunjukkan bahwa penambahan konsentrasi PEG 6000 0% pada kalus tanaman gambir (*Uncaria gambir* Roxb.) menunjukkan tekstur kalus remah. Relevan dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Rusdianto (2009), kalus wortel (*Daucus carota* L) yang terbentuk setelah diinduksi dengan PEG 6000 25 mg/l bertekstur remah.

Menurut Rahmawati (2007), tekstur kalus yang semakin remah (*friable*) mengalami pembelahan sel yang lebih cepat dari pada tekstur kalus yang kompak. Sel-sel kalus yang terbentuk bersifat remah (*friable*) memiliki ciri-ciri antara satu sel dengan sel lainnya mudah dipisahkan. Bila diambil menggunakan pinset, maka sel-sel kalus akan mudah menempel pada pinset. Menurut Widiarso (2010) dalam Arianto *et al.* (2013), kalus tipe intermediet merupakan massa kalus yang terdiri dari kelompok sel-sel yang sebagian kompak dan sebagian lainnya remah.

#### 4.2 Pengaruh Konsentrasi PEG 6000 terhadap Kuantitas Kalus Daun Afrika (*Vernonia amygdalina*)

Penambahan beberapa konsentrasi PEG 6000 pada media perlakuan memiliki pengaruh yang berbeda nyata terhadap sifat kuantitatif kalus daun afrika. Berdasarkan hasil ANOVA menunjukkan bahwa terdapat pengaruh beberapa konsentrasi PEG 6000 (0 mg/l, 5 mg/l, 15 mg/l dan 25 mg/l) terhadap kuantitas kalus daun afrika (*Vernonia amygdalina*) yang meliputi hari munculnya kalus, persentase kalus dan berat kalus. Selanjutnya data di uji lanjut menggunakan *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) 5 % yang disajikan pada tabel 4.2 berikut ini:

Tabel 4.2 Pengaruh Konsentrasi PEG 6000 terhadap Kuantitas Kalus

<b>Konsentrasi PEG 6000</b>	<b>Hari Muncul Kalus (HST)</b>	<b>Persentase Kalus (%)</b>	<b>Berat Kalus (gr)</b>
0 mg/l	16,2 d	46,67 a	0.004 a
5 mg/l	10,4 b	73,33 bc	0.138 bc
15 mg/l	7,2 a	93,33 c	0.206 c
25 mg/l	14,2 c	53,3 ab	0.074 ab

Keterangan: Angka yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji DMRT 5 %.

Tabel 4.2 menunjukkan bahwa media yang ditambahkan beberapa konsentrasi PEG 6000 memberikan pengaruh yang berbeda nyata pada hari muncul kalus, persentase kalus dan berat kalus. Pada pengamatan hari muncul kalus, perlakuan PEG

15 mg/l menunjukkan kalus yang paling cepat tumbuh yaitu 7,2 HST dan yang paling lama tumbuh kalus adalah pada perlakuan PEG 0 mg/l (kontrol) yaitu 16,2 HST.

Pengamatan persentase kalus menunjukkan bahwa pada perlakuan PEG 15 mg/l merupakan kalus yang persentase tumbuh kalusnya paling tinggi yaitu 93,33 %, sedangkan persentase tumbuh kalus yang paling rendah pada perlakuan PEG 0 mg/l (kontrol) yaitu 46,67 %. Pada pengamatan berat kalus, berat tertinggi pada perlakuan PEG 15 mg/l yaitu 0,206 gr, sedangkan berat terendah pada perlakuan PEG 0 mg/l yaitu 0.004 gr.

Penambahan beberapa konsentrasi PEG 6000 dalam media kultur memiliki pengaruh terhadap kuantitas kalus, karena PEG menciptakan cekaman kekeringan yang menyebabkan kalus tanaman mengalami osmosis yang dicirikan dengan dihasilkannya prolin. Salah satu senyawa terlarut yang berperan dalam proses pengaturan tekanan osmotik adalah poliamin. Poliamin memiliki peran yang besar pada pembelahan sel dan perkembangan organ. Diduga dengan semakin tingginya senyawa poliamin, maka pembelahan sel pada kalus juga semakin besar. Menurut Baron dan Stasolla (2008) memberikan daftar yang lebih panjang lagi terhadap keterlibatan poliamin dalam proses fisiologis tumbuhan. Proses tersebut meliputi pembelahan sel, embriogenesis, organogenesis, respons stres, fotosintesis, dan berinteraksi dengan hormon.

Menurut hasil penelitian, maka dapat diketahui bahwa beberapa konsentrasi PEG 6000 mempunyai pengaruh terhadap kuantitas kalus daun afrika (*Vernonia amygdalina*). Berdasarkan hasil penelitian, konsentrasi PEG 15 mg/l merupakan

konsentrasi yang optimal untuk pertumbuhan kalus. Hal tersebut ditunjukkan dengan paling cepatnya tumbuh kalus, tingginya persentase kalus dan berat kalus jika dibandingkan dengan perlakuan kontrol dan beberapa konsentrasi lainnya. Namun konsentrasi PEG 6000 yang lebih efisien adalah PEG 5 mg/l. Konsentrasi PEG 6000 yang tepat akan menghasilkan kalus yang pertumbuhannya optimal. Allah SWT telah menciptakan segala sesuatu sesuai dengan kadar masing-masing. Seperti firman Allah SWT surat Al-A'laa (87) ayat 3,

وَالَّذِي قَدَّرَ فَهَدَىٰ ﴿٣﴾

Artinya: ” dan yang menentukan kadar (masing-masing) (Q.S. Al-A'laa (87): 3).

Kata قَدَّرَ berarti “kadar (masing-masing)”. Ali RA, As-Sulami dan Al Kisa'i membaca قَدَّرَ yakni dengan huruf dal tanpa tasydid. Sedangkan lainnya membaca dengan dal bertasydid. Namun keduanya bermakna sama yaitu Allah SWT menentukan dan menyesuaikan setiap bentuk dengan bentuknya. Sedangkan kata فَهَدَىٰ memiliki arti memberi petunjuk اَرشَدًا. Diriwayatkan dari Muhajid, dia berkata, “Dia memberi petunjuk kepada manusia kepada kebahagiaan dan kecelakaan dan memberi petunjuk kepada binatang kepada tempat-tempat penggembalaan (Qurthubi, 2009).

Ayat ke-3 dari surat Al-A'laa menjelaskan bahwa Allah SWT menciptakan segala sesuatu sesuai dengan kadar masing-masing. Allah SWT mengisyaratkan

bahwa terdapat rahasia di balik kata “kadar” yang harus dikaji dan dipelajari. Sehingga dalam penelitian ini dilakukan beberapa percobaan yaitu dengan menambahkan berbagai konsentrasi PEG 6000 pada media perlakuan, tujuannya untuk mengetahui pada konsentrasi mana yang memiliki pengaruh yang nyata pada kalus daun afrika.

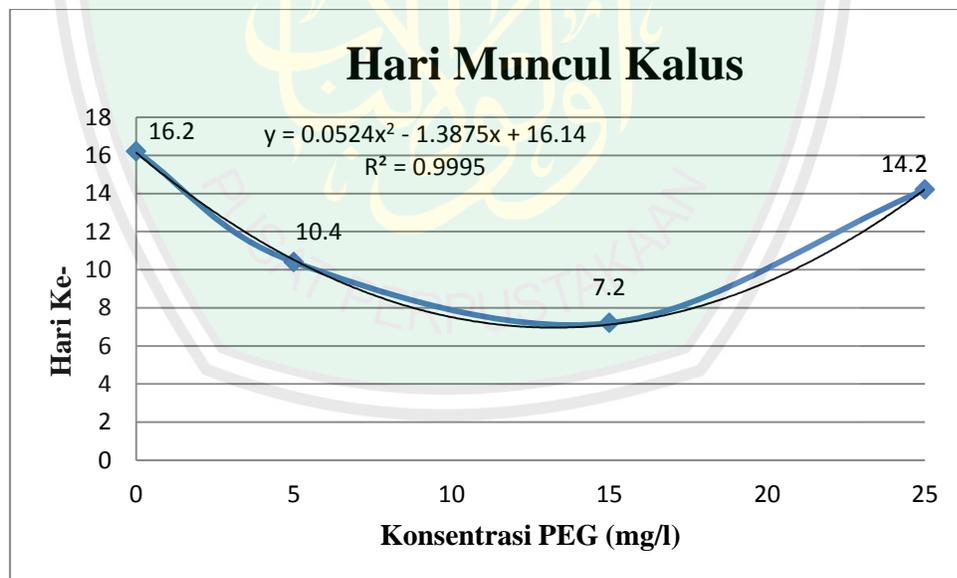
Beberapa dari ayat Al-Quran dapat dipahami bahwa setiap makhluk telah ditetapkan takdirnya oleh Allah SWT. Mereka tidak dapat melampaui batas ketetapan itu, dan Allah SWT menuntun dan menunjukkan mereka kearah yang seharusnya mereka tuju. Begitu dipahami antara lain dari ayat-ayat permulaan Surat Al-A’laa yang artinya, “*Sucikanlah nama Tuhanmu yang Maha Tinggi, yang Menciptakan, dan menyempurnakan (penciptaan-Nya), dan yang menentukan kadar (masing-masing) dan memberi petunjuk*” (Shihab, 1996).

Makhluk-Nya yang kecil dan remeh pun diberi-Nya takdir. Lanjutan ayat *Sabbihisma* yang dikutip diatas menyebutkan contoh, yakni rerumputan. “*dan yang menumbuhkan rumput-rumputan, lalu dijadikannya rumput-rumputan itu kering kehitam-hitaman.*” Mengapa rerumputan itu tumbuh subur, dan mengapa pula ia layu dan kering. Berapa kadar kesuburan dan kekeringannya, kesemuanya telah ditetapkan oleh Allah SWT. Melalui hukum-hukum-Nya yang berlaku pada alam raya ini. Ini berarti jika Anda ingin melihat rumput subur menghijau, maka siramilah ia, dan bila Anda membiarkannya tanpa pemeliharaan, diterpa panas matahari yang terik, maka pasti ia akan mati kering kehitaman-hitaman atau ghutsan ahwa seperti bunyi ayat

diatas. Demikian takdir Allah SWT yang mampu menjangkau seluruh makhluk-Nya (Shihab,1996).

#### 4.2.1 Hari Muncul Kalus

Hari muncul kalus pada eksplan dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu eksplan yang ditanam, media yang digunakan dan kondisi lingkungan seperti cahaya dan temperatur. Penelitian ini menunjukkan bahwa penambahan beberapa konsentrasi PEG 6000 memiliki pengaruh yang cukup besar terhadap hari munculnya kalus. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat diketahui hari munculnya kalus setiap perlakuan dan kalus yang paling cepat tumbuh serta kalus yang paling lama tumbuh. Hal ini dapat dilihat pada gambar grafik di bawah ini:



Gambar 4.1 Grafik Hari Muncul Kalus

Berdasarkan grafik tersebut, maka dapat diketahui bahwa kalus yang paling cepat tumbuh adalah kalus pada media PEG 15 mg/l dan yang paling lama tumbuh adalah kalus pada media PEG 0 mg/l. Selain itu, didapatkan pula nilai  $R_2$  99% yang ditunjukkan dengan nilai  $R_2 = 0,9995$ . Nilai tersebut menunjukkan bahwa terdapat korelasi yang tinggi antara konsentrasi PEG 6000 dengan hari munculnya kalus. Kalus yang paling cepat tumbuh yaitu pada media PEG 15 mg/l, disebabkan karena pada konsentrasi tersebut merupakan konsentrasi yang tepat untuk pertumbuhan kalus daun afrika. Sedangkan kalus yang paling lama tumbuh yaitu kalus pada media PEG 0 mg/l, disebabkan karena pada konsentrasi tersebut kurang tepat untuk pertumbuhan kalus sehingga kalus tidak beregenerasi dengan baik.

Media yang ditambahkan PEG telah digunakan untuk menciptakan kondisi cekaman kekeringan dengan menurunkan potensial air pada medium, sehingga menyebabkan kalus mengalami osmosis yang dicirikan dengan dihasilkannya prolin. Salah satu senyawa terlarut yang berperan dalam proses pengaturan tekanan osmotik adalah poliamin. Poliamin berperan dalam proses fisiologis tumbuhan. Proses tersebut meliputi pembelahan sel, embriogenesis, organogenesis, respon stres, fotosintesis, dan berinteraksi dengan hormon (Baron dan Stasolla, 2008). Berdasarkan literatur tersebut maka dengan penambahan konsentrasi PEG 6000 yang tepat dapat membantu pertumbuhan kalus daun afrika. Diduga bahwa yang membantu pertumbuhan kalus adalah senyawa poliamin karena perannya dalam pembelahan sel.

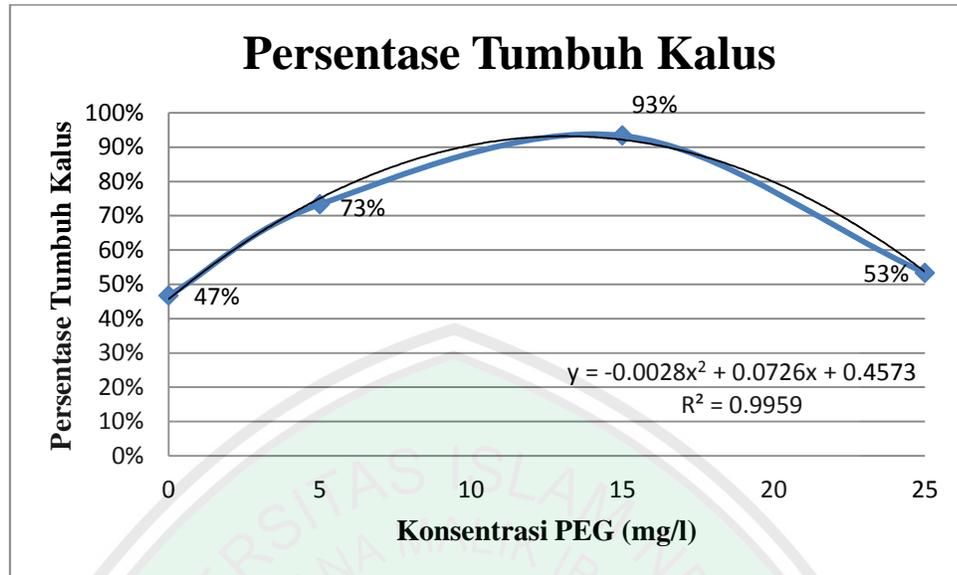
Menurut Sulistyati dan Dameria (2013), pertumbuhan kalus merupakan hasil interaksi yang sangat kompleks antara eksplan, komposisi medium dan kondisi

lingkungan selama periode inkubasi. Sel-sel memperlihatkan peningkatan aktivitas sitoplasmik yang ditandai dengan meningkatnya respirasi dan jaringan kembali kekeadaan meristematik (dediferensiasi). Selama pertumbuhannya kalus dapat mengalami lignifikasi yang cukup kuat hingga menyebabkan kalus bertekstur keras dan kompak, ada juga yang friabel dan lunak sehingga mudah terpecah-pecah menjadi serpihan-serpihan kecil.

Sel-sel yang heterogen dari jaringan yang kompleks menunjukkan pertumbuhan yang berbeda. Dengan mengubah komposisi media, terjadi seleksi sel-sel yang mempunyai sifat khusus. Hal ini berarti bahwa media tumbuh menentukan komposisi kalus. Sel yang jumlahnya paling banyak merupakan sel-sel yang paling cepat membelah dan sel yang paling sedikit adalah sel yang paling lambat pertumbuhannya. Media seleksi dapat berdasarkan unsur-unsur hara atau zat pengatur tumbuh yang ditambahkan ke dalam media (Siti *et al.*, 2008).

#### **4.2.2 Persentase Tumbuh Kalus**

Persentase tumbuh kalus merupakan salah satu parameter kuantitatif yang diamati pada penelitian ini. Tujuan pengamatan persentase tumbuh kalus adalah untuk mengetahui apakah ada pengaruh penambahan PEG 6000 terhadap persentase tumbuh kalus setiap perlakuan. Dari hasil pengamatan, maka diperoleh hasil persentase tumbuh paling besar dan persentase tumbuh paling kecil. Untuk mengetahui korelasi persentase tumbuh kalus pada setiap perlakuan dengan beberapa konsentrasi PEG 6000, maka dapat dilihat pada gambar grafik dibawah ini:



Gambar 4.2 Grafik Persentase Tumbuh Kalus

Berdasarkan pengamatan maka dapat diketahui masing-masing persentase tumbuh kalus pada setiap perlakuan. Persentase tumbuh kalus tertinggi adalah kalus pada media PEG 15 mg/l yaitu 93% dan kalus yang persentase tumbuh kalus paling rendah adalah PEG 0 mg/l yaitu 47%. Dari grafik di atas, didapatkan nilai  $R_2$  99% yang ditunjukkan dengan nilai  $R_2 = 0.9959$ . Hal ini menunjukkan bahwa terdapat korelasi yang tinggi antara konsentrasi PEG 6000 dengan persentase tumbuh kalus. Persentase tumbuh kalus semakin meningkat dalam media PEG 15 mg/l dan menurun pada media PEG 25 mg/l. Semakin tinggi konsentrasi PEG 6000 dalam media menyebabkan terhambatnya pertumbuhan kalus.

Pemberian konsentrasi PEG 6000 yang terlalu tinggi pada kalus menyebabkan kalus sulit menyerap air sehingga mengakibatkan stres osmosis yang berlebihan dan kalus mengalami penurunan kemampuan regenerasi sel, bahkan bisa mati.

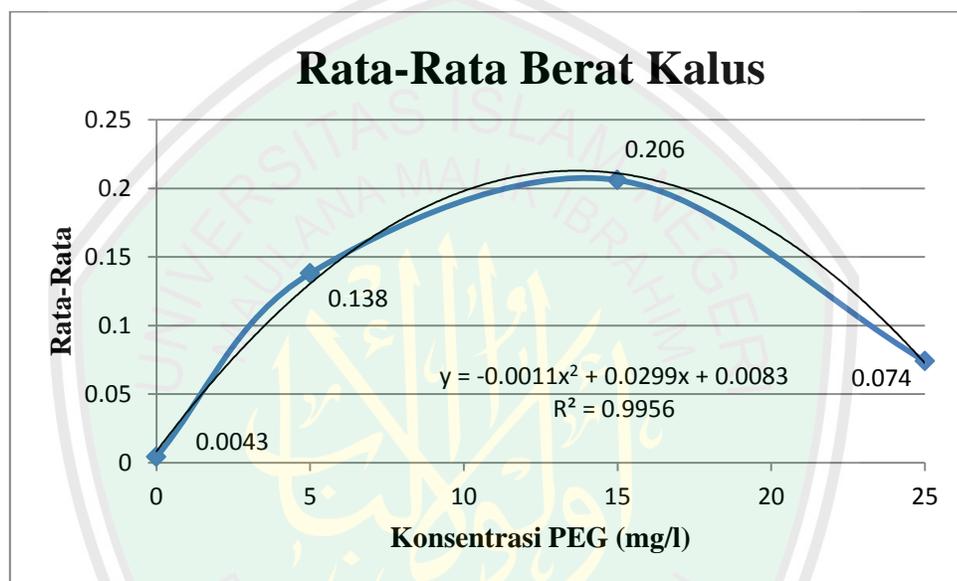
Kemampuan kalus dapat bertahan hidup pada media selektif PEG 6000 tergantung dari konsentrasi PEG, jenis tanaman dan lamanya kalus mengalami tekanan seleksi dalam media yang diberi cekaman osmosis (Laila dan Savitri, 2014). Berdasarkan literatur tersebut, maka dapat disimpulkan bahwa pada konsentrasi PEG 25 mg/l kalus mengalami stres osmosis yang berlebihan sehingga mengalami penurunan persentase tumbuh kalus. Sedangkan pada konsentrasi 15 mg/l merupakan konsentrasi yang tepat untuk pertumbuhan kalus yang dibuktikan dengan kalus masih mampu bertahan hidup dengan baik pada konsentrasi tersebut.

George (1993) melaporkan bahwa kemampuan kalus bergenerasi dipengaruhi oleh kondisi eksplan (kalus) dan komposisi media regenerasi. Biswas *et al.* (2002) dalam Sutjahjo (2007) menambahkan, kondisi kalus pada saat diregenerasikan telah mengalami tekanan seleksi menggunakan PEG akan menyebabkan penurunan persentase tumbuh kalus. Kalus yang mengalami tekanan seleksi yang lebih berat akan mengalami kerusakan fisiologi dan gangguan metabolime. Ketidakmampuan kalus bergenerasi disebabkan karena tidak seimbang komposisi media. Duncan *et al.* (1995) dalam Sutjahjo (2007) melaporkan terjadinya penurunan persentase kalus bergenerasi sejalan meningkatnya konsentrasi PEG. Hal inilah yang menyebabkan kalus pada media PEG 25 mg/l mengalami penurunan regenerasi.

#### **4.2.3 Berat Kalus**

Pengamatan berikutnya adalah mengenai pengaruh beberapa konsentrasi PEG 6000 dengan konsentrasi 0 mg/l (kontrol), 5 mg/l, 15 mg/l dan 25 mg/l terhadap berat

basah kalus daun afrika. Penambahan beberapa konsentrasi PEG 6000 memiliki pengaruh yang besar terhadap berat basah kalus. Berdasarkan data yang diperoleh melalui ANOVA, menunjukkan bahwa terdapat pengaruh yang berbeda nyata pada pemberian PEG 6000 terhadap berat kalus. Berikut ini adalah gambar grafik rata-rata berat kalus daun afrika:



Gambar 4.3 Grafik Rata-Rata Berat Kalus

Berdasarkan hasil pengamatan, maka dapat diketahui rata-rata berat kalus daun afrika pada setiap perlakuan. Rata-rata berat kalus tertinggi adalah kalus pada media PEG 15 mg/l yaitu 0,21 gr dan rata-rata berat kalus paling rendah adalah PEG 0 mg/l yaitu 0,0015 gr. Dari grafik di atas, didapatkan nilai  $R^2$  99% yang ditunjukkan dengan nilai  $R^2 = 0.9956$ . Hal ini menunjukkan bahwa terdapat korelasi yang tinggi antara konsentrasi PEG 6000 dengan rata-rata berat kalus. Hasil penelitian ini

menunjukkan bahwa rata-rata berat kalus semakin meningkat pada media PEG 15 mg/l dan menurun pada media PEG 25 mg/l. Semakin tinggi konsentrasi PEG 6000 yang ditambahkan pada media, maka rata-rata berat basah kalus akan semakin kecil. Widoretno *et al.* (2003) melaporkan bahwa semakin tinggi konsentrasi PEG, maka semakin sedikit jumlah struktur embrio somatik yang terbentuk.

Hasil penelitian ini relevan dengan penelitian Pristantho *et al.* (2011), pada konsentrasi PEG 0 g/100 mL (kontrol) nilai rerata berat basah kalus sebesar 1,2632 g, PEG 5 g/100 mL rerata nilai berat basah kalus sebesar 0,9726 g, PEG 10 g/100 mL rerata nilai berat basah kalus sebesar 0,9307 g, PEG 15 g/100 mL rerata nilai berat basah kalus sebesar 0,5373 g, dan PEG 20 g/100 mL rerata nilai berat basah kalus sebesar 0,4269 g. Melihat nilai masing-masing perlakuan tersebut maka dapat diketahui bahwa semakin tinggi konsentrasi PEG maka nilai rerata berat basah kalus akan semakin kecil.

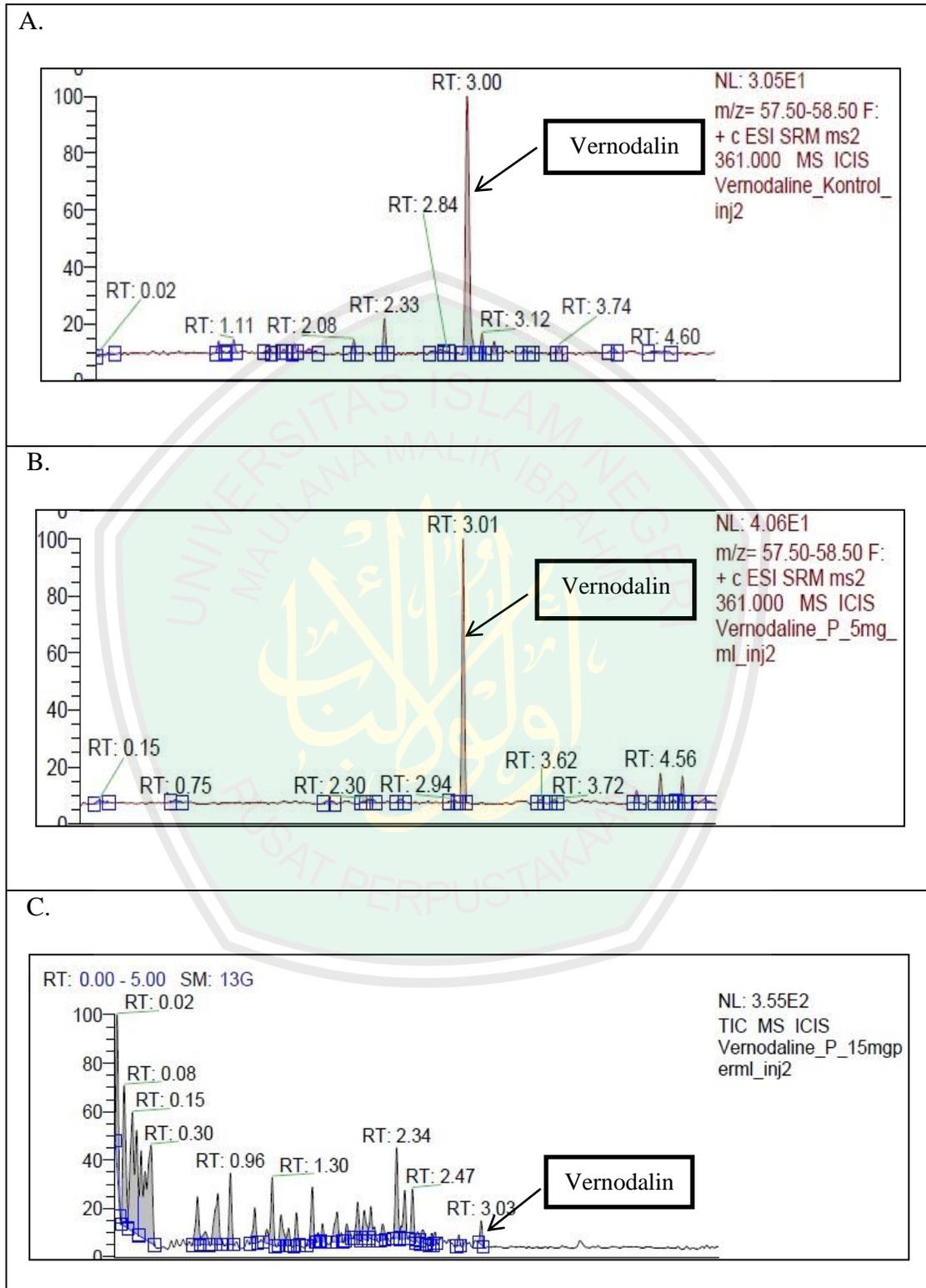
#### **4.3 Uji Kualitatif Metabolit Sekunder Vernodalin pada Kalus Daun Afrika (*Vernonia amygdalina*)**

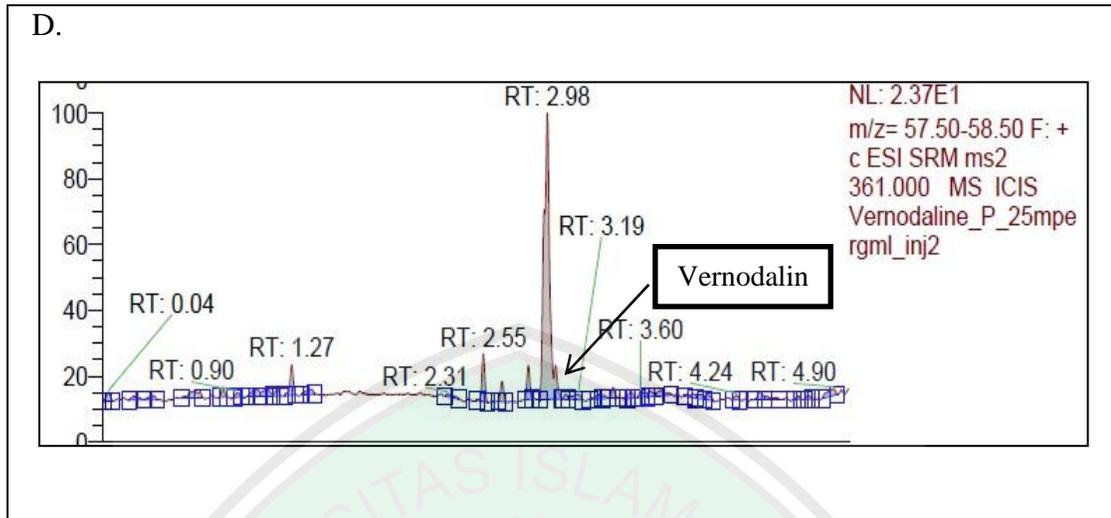
Vernodalin merupakan salah satu metabolit sekunder tanaman daun afrika (*Vernonia amygdalina*) dan termasuk golongan terpenoid yaitu seskuiterpen lakton. Vernodalin memiliki beberapa aktivitas sebagai antitumor, antikanker dan antibakteri (Njan *et al.*, 2008). Beberapa penelitian telah membuktikan bahwa tanaman daun afrika maupun ekstrak daun afrika mengandung metabolit sekunder vernodalin. Namun untuk penelitian mengenai metabolit sekunder vernodalin pada kalus daun

afrika belum pernah dilakukan. Maka dari itu perlu dilakukan penelitian ini yaitu uji metabolit sekunder vernodalin pada kalus daun afrika. Pada penelitian ini, uji vernodalin pada kalus daun afrika dilakukan secara kualitatif.

Produksi vernodalin kalus daun afrika pada penelitian ini dilakukan secara kualitatif yaitu menggunakan metode LC-MS/MS (*Liquid Chromatograph-tandem Mass Spectrometry*). Looi *et al.* (2013) menginformasikan bahwa LC-MS/MS adalah teknik yang banyak digunakan untuk berbagai aplikasi yang memiliki sensitivitas dan spesifisitas sangat tinggi. LC-MS/MS menggabungkan kemampuan pemisahan kimia dari LC dengan kemampuan dari spektroskopi massa untuk menyeleksi temuan dan mengkonfirmasi identitas molekuler. MS merupakan salah satu metode yang lebih sensitif dan selektif untuk menganalisis molekuler, serta menyediakan informasi pada berat molekul sebaik pada fragmentasi dari molekul analit.

Berdasarkan hasil penelitian, maka dapat diketahui bahwa senyawa vernodalin pada kalus daun afrika berhasil diidentifikasi menggunakan LC-MS/MS. Vernodalin terdeteksi pada semua perlakuan PEG 6000 (0 mg/l, 5 mg/l, 15 mg/l dan 25 mg/l) dan pada waktu  $\pm$  3 menit. Hal ini didasarkan pada literatur Looi *et al.* (2013), yang menginformasikan bahwa dengan membandingkan data MS dan fragmen MS/MS maka dapat diketahui bahwa vernodalin memiliki berat molekul 360 dan beberapa fragmen yaitu 259, 247, 86, 58 serta dapat teridentifikasi pada menit ke-3. Berikut ini beberapa gambar kromatogram terdeteksinya vernodalin menggunakan LC-MS/MS pada kalus daun afrika:





Gambar 4.4 Kromatogram LC-MS/MS (A) Puncak terdeteksinya vernodalin pada perlakuan PEG 0 mg/l, (B) Puncak terdeteksinya vernodalin pada perlakuan PEG 5 mg/l, (C) Puncak terdeteksinya vernodalin pada perlakuan PEG 15 mg/l, (D) Puncak terdeteksinya vernodalin pada perlakuan PEG 25 mg/l.

Berdasarkan hasil analisis vernodalin menggunakan LC-MS/MS pada semua perlakuan, maka diperoleh hasil bahwa pada perlakuan kontrol (PEG 0 mg/l) menunjukkan bahwa pada kalus daun afrika terdapat senyawa vernodalin. Hasil analisis menunjukkan bahwa vernodalin teridentifikasi pada semua fragmen. Hal ini ditunjukkan dengan adanya puncak yang tinggi pada setiap fragmen yaitu pada fragmen induk (360-361) puncak vernodalin muncul pada menit ke 3.13, pada fragmen 57.50-58.50 puncak vernodalin muncul pada menit ke 3.00, pada fragmen 85.50-86.50 puncak vernodalin muncul pada menit ke 3.13, pada fragmen 246.50-247.50 puncak vernodalin muncul pada menit ke 3.05, pada fragmen 258.50-259.50 puncak vernodalin muncul pada menit ke 3.13 (Lampiran 8). Dari data diatas, dapat

disimpulkan bahwa kalus daun afrika pada perlakuan PEG 0 mg/l terdapat senyawa vernodalin.

Hasil analisis pada perlakuan PEG 5 mg/l menunjukkan bahwa senyawa vernodalin terlihat puncaknya pada beberapa fragmen yaitu pada fragmen induk (360-361) puncak vernodalin muncul pada menit ke 3.01, pada fragmen 57.50-58.50 puncak vernodalin muncul pada menit ke 3.01, pada fragmen 85.50-86.50 puncak vernodalin muncul pada menit ke 2.98 (Lampiran 8). Pada perlakuan PEG 15 mg/l menunjukkan bahwa vernodalin masih terdeteksi pada beberapa fragmen juga yaitu pada fragmen induk (360-361) puncak vernodalin muncul pada menit ke 3.03, pada fragmen 57.50-58.50 puncak vernodalin muncul pada menit ke 2.98 dan pada fragmen 258.50-259.50 puncak vernodalin terlihat pada menit ke 3.03 (Lampiran 8). Dari data diatas dapat diketahui bahwa pada perlakuan PEG 15 mg/l masih ditemukan adanya senyawa vernodalin, walaupun tidak semua fragmen terdapat puncak vernodalin. Sedangkan pada perlakuan PEG 25 mg/l vernodalin terdeteksi pada 57.50-58.50 menit ke 2.98 (Lampiran 8).

Berdasarkan hasil analisis secara kualitatif menggunakan LC-MS/MS, kalus daun afrika (*Vernonia amygdalina*) terdeteksi mengandung metabolit sekunder vernodalin pada semua perlakuan. Hal ini ditunjukkan dengan adanya puncak pada setiap fragmen masing-masing perlakuan. Puncak tersebut menunjukkan adanya vernodalin pada sampel. Selain puncak, waktu juga ikut menentukan adanya vernodalin dalam sampel yang diuji menggunakan LC-MS/MS. Berdasarkan literatur Looi *et al.* (2013) vernodalin terdeteksi pada waktu retensi (RT) menit ke 3 dan pada

fragmen-fragmen tertentu yaitu 259, 247, 86, 58. Menurut Asmoro (2012), perbedaan waktu terdeteksinya senyawa yang diuji dengan literatur dapat disebabkan karena kondisi kolom yang digunakan berbeda, seperti umur kolom atau panjang kolom yang digunakan.



## **BAB V**

### **PENUTUP**

#### **5.1 Kesimpulan**

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka diperoleh beberapa kesimpulan sebagai berikut:

1. Penambahan berbagai konsentrasi PEG 6000 pada media perlakuan tidak memiliki pengaruh yang nyata terhadap sifat kualitatif kalus daun afrika yang meliputi warna dan tekstur kalus. Sedangkan penambahan berbagai konsentrasi PEG 6000 pada media perlakuan, memiliki pengaruh yang berbeda nyata terhadap sifat kuantitatif kalus daun afrika. Berdasarkan hasil pengamatan, kalus yang paling baik pertumbuhannya adalah kalus dengan perlakuan PEG 15 mg/l yang ditunjukkan dengan pertumbuhan kalus paling cepat, persentase tumbuh kalus tertinggi dan berat kalus tertinggi. Tetapi konsentrasi PEG 6000 yang lebih efisien adalah PEG 5 mg/l.
2. Uji kualitatif metabolit sekunder vernodalin pada kalus daun afrika (*Vernonia amygdalina*) menggunakan LC-MS/MS menunjukkan bahwa pada semua kalus daun afrika terdapat metabolit sekunder vernodalin. Hal ini ditunjukkan dengan adanya puncak yang terdeteksi sebagai vernodalin pada setiap perlakuan.

## 5.2 Saran

Berdasarkan hasil dari penelitian dapat dikemukakan saran sebagai berikut:

1. Perlu dilakukan penelitian lanjutan mengenai pengujian metabolit sekunder vernodalin secara kuantitatif pada kalus daun afrika (*Vernonia amygdalina*), agar dapat dilihat berapa banyak kadar vernodalin yang terkandung didalam kalus daun afrika.
2. Perlu dilakukan penelitian mengenai pengaruh media yang berbeda dengan penelitian yang telah dilakukan ini.



## DAFTAR PUSTAKA

- Abidin, Z. 1985. *Dasar-Dasar Pengetahuan Tentang Zat Pengatur Tumbuh*. Bandung : Angkasa.
- Adri, Rantih Fadhlya. 2012. Pengaruh 2,4-D Terhadap Pembentukan Embrio Somatik Tanaman Gambir (*Uncaria Gambir* Roxb.) Dan Uji Responnya Terhadap PEG dalam Upaya Memperoleh Klon Gambir Toleran Cekaman Kekeringan. *Artikel*. Program Pascasarjana Universitas Andalas Padang.
- Akpaso MI., Atangwho IJ., Akpantah A., Fischer VA., Igiri AO., Ebong PE. 2011. Effect of combined extracts of *Vernonia amygdalina* (bitter leaf) and *Gongronema latifolium* (Utazi) on the pancreatic  $\beta$ -cells of streptozotocin-induced diabetic rats. *British Journal Medicine & Medical Research Vol.1(1)*.
- Alca'zar, R. F. Marco, J. C. Cuevas, M. Patron, A. Ferrando, P. Carrasco, A. F. Tiburcio, T. Altabella. 2006. Involvement of Polyamines in plant response to abiotic stress. *Biotechnol Lett* 28: 1867-1876.
- Aliero AA, Abdullahi L. 2009. Effect of drying on the nutrient composition of *Vernonia amygdalina* leaves. *Journal Phytology, 1(1)*.
- Alitalia, Y. 2008. Pengaruh Pemberian BAP dan NAA Terhadap Pertumbuhan dan Perkembangan Tunas Mikro Kantong Semar (*Nepenthes mirabilis*) *Skripsi*. Program Studi Hortikultura, Fakultas Pertanian Institut Pertanian Bogor.
- 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.
- Anggarwulan, E. dan Solichatun. 2001. *Fisiologi Tumbuhan*. FMIPA, UNS. Surakarta.
- Arianto, B. dan M.U. Bustamil. 2013. Induksi Kalus Dua Klon Kakao (*Theobroma cacao* L.) Unggul Sulawesi Pada Berbagai Konsentrasi 2,4 Dichlorophenoxy Acetic Acid Secara *In Vitro*. *e-J. Agrotekbis 1 (3)*.
- Asmoro, K.A., Prihatiningtyas, S., Darmawati, A. 2012. Optimasi Preparasi Sampel Untuk Analisis Deltametrin Dalam Kubis (*Brassica oleracea* var. capitata). *Jurnal Kimia Farmasi*. Departemen Kimia Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga.

- Astuti, A.F. 2008. *Ekspresi Gen Responsif Terhadap Reactive Oxygen Species Pada Hevea brasiliensis Akibat Pelukaan Dan Etilena Eksogen*. Program Studi Biokimia Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian Bogor.
- Asuquo OR., Edet AG., Mesembe OE., Atanghwo JI. 2010. Ethanolic extracts of *Vernonia amygdalina* and *Ocimum gratissimum* enhance testicular improvement in diabetic wistar rats. *Int J Alt Med*, Vol. 8(2).
- Atanghwo JI., Ebong PE., Eteng MU., Eyong EU., Obi AU. 2007. Effect of *Vernonia amygdalina* Del. leaf on kidney function of diabetic rats. *Int. J. Pharmacol*, Vol.3.
- Audu SA., Taiwo AE., Ojuolape AR. 2012. A study review of documented phytochemistry of *Vernonia amygdalina* (Family Asteraceae) as the basis for pharmacologic activity of plant extract. *Journal Natural Sciences Research* Vol.2 No.7.
- Azizah, I. S. 2010. Respon Kalus Kedelai (*Glycine max* L. Merr) Pada Media B5 dengan Penambahan PEG (Polyethylena Glycol) 6000 Sebagai Simulasi Cekaman Kekeringan. *Skripsi*. Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi UIN Malang.
- Baron, K. and C. Stasolla. 2008. The role of Polyamines during in vivo and in vitro Development. *In Vitro Cell.Dev.Biol.Plant* 44:384–395.
- Choirul. 2003. Berita Biologi : *Jurnal Ilmiah Nasional* Vol. 6 No. 4, Pusat Penelitian Biologi.
- Darwati, I. 2007. Kultur Kalus Akar Rambut Purwoceng (*Pimpinella pruatjan* Molk) Untuk Metabolit Sekunder. *Skripsi*. Institut Pertanian Bogor.
- Ehsanpour, A. A., and R. Razavizadeh. 2005. Effect of UV-C on Drought Tolerance of Alfalfa (*Medicago sativa*) Callus. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* 1 (2).
- Eleyinmi AF., Sporns P, Bressler DC. 2008. Nutritional composition of *Gongronema latifolium* and *Vernonia amygdalina*. *Nutr. Food Sci.*, 38.
- Erasto P, Grierson DS., Afolayan AJ. 2006. Bioactive sesquiterpene lactones from the leaves of *Vernonia amygdalina*. *J. Ethnopharmacol*, 106.

- Ernawati, A. 1992. *Produksi senyawa-senyawa Metabolit Sekunder dengan Kultur Jaringan Tanaman*. I. Wattimena G A. Gunawan L W. Matjik N A. Syamsudin E, Wiendi NMA, Editor. Bioteknologi Tanaman I. Bogor: PAU Bioteknologi IPB.
- Fakhri, A. 2010. Kultur In Vitro Tanaman *Theobroma cacao* dengan Variasi Polietilen Glikol (PEG) 6000 dan Potensinya Untuk Produksi Metabolit Sekunder Katekin. *Skripsi*. Jurusan Kimia. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Andalas. Padang.
- Fitriani, A. 2003. Kandungan Ajmalisin pada Kultur Kalus *Catharanthus roseus* (L). G. Don. Setelah Dielisisasi Homogenat Jamur *Phyihium aphanidermatum* Edson Fitzp. *Makalah Pengantar Sains*. PPS702.
- Gamborg, O. L., and J. P. Shyluk. 1981. *Nutrition media and characteristics of plant cell and tissue cultures* in T. A. Thorpe (Ed.). *Plant Tissue Culture Methods and Aplication For Agriculture*. New York : Academic Press.
- George, E. F. 1993. *Plant Propagation by Tissue Culture, Part 1, 2nd Edition*. England : Exegetic Limited.
- George, E. F. and P. H. Sherrington. 1984. *Plant Propagation by Tissue Culture*. England : Eastern Press Exegetic Ltd.
- George, M.J and Jones, G.R. 2008. *Understanding ang Managing Organizational Behavior*. New Jersey : Pearson Education.
- Ginting, M. K. 2012. Validasi Metode LC-MS/MS Untuk Penentuan Senyawa Asam Trans, Trans-Mukonat, Asam Hippurat, Asam 2-Metil Hippurat, Asam 3-Metil Hippurat, Asam 4-Metil Hippurat dalam Urin Sebagai Biomaker Paparan Benzena, Toluena dan Xilena. *Skripsi*. Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.
- Gunawan, I.W. 1995. *Teknik In Vitro Dalam Hortikultura*. Jakarta : Penerbit Swadaya.
- Gunawan, L.W. 1988. *Teknik Kultur Jaringan Tumbuhan*. PAU Bioteknologi, Institut pertanian bogor, Bogor.
- Hammond-Kosack, K.E., Jones, D.A. and Jones, J.D.G. 1996. Ensnaring microbes: The components of plant disease resistance. *New Phytologist*.

- Harahap, R.A. 2005. Studi Kultur Kalus Tanaman Pegagan (*Centella asiatica* L.) untuk Menghasilkan Senyawa Asiatikosida. *Tugas Akhir*. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Hartanti, M.F., Nurhidayanti. T., Muryono M. 2013. Budidaya Tanaman Tembakau (*Nicotiana tabacum*. L. var. Prancak 95) pada Cekaman Kekeringan PEG Secara *In Vitro*. <https://www.google.com/digilib.its.ac.id/> (diakses tgl 29 Oktober 2015).
- Hartmann, H.T., D.E. Kester, and F.T. Davies. 1990. *Plant Propagation : Principles and Practices*. 5<sup>th</sup> ed. Singapore : Prentice Hall Inc.
- Hendaryono, D.P.S. dan A Wijayani. 1994. *Teknik Kultur Jaringan*. Pengenalan dan Petunjuk Perbanyakkan Tanaman secara Vegetatif-Modern. Yogyakarta : Kanisius.
- Ijeh, I. I.; and Ejike, C. E. C. C. (2011). Current perspectives on the medicinal potentials of *Vernonia amygdalina* Del. *Journal of Medicinal Plants Research*. Vol. 5 (7) : 1051 - 1061.
- Indah , Nur P, dan Ermavitalini, Dini. 2013. Induksi Kalus Daun Nyamplung (*Calophyllum inophyllum* Linn.) pada Beberapa Kombinasi Konsentrasi 6-Benzylaminopurine (BAP) dan 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D). *Jurnal Sains Dan Seni Pomits*, Vol. 2, No.1. Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS) Surabaya.
- Izevbigie, E.B. 2003. Discovery of water-soluble anticancer agents (edotides) from a vegetable found in Benin City, Nigeria. *Exp. Biol. Med.*, 228.
- Khalafalla, M.A., Abdellatef E., Daffalla H.M., Nassrallah A.A., Enein, Khalid M.A., Lightfoot D.A., Cocchetto A., El-Shemmy H.A. 2009. Antileukimia activity from root cultures of *Vernonia amygdalina*. *Journal of Medicinal Plants Research*, Vol. 3 No.8.
- Kurniawati, S., Khumaida N., Ardie S.W., Hartati N.S., Sudarmonowati E. 2014. Pola Akumulasi Prolin dan Poliamin Beberapa Aksesori Tanaman Terung pada Cekaman Kekeringan. *J. Agron. Indonesia* 42 (2) : 136 – 141.
- Laila, F.N dan Savitri E.S. 2014. Produksi Metabolit Sekunder Steviosida Pada Kultur Kalus Stevia (*Stevia rebaudiana* Bert. M.) Dengan Penambahan ZPT 2,4-D Dan PEG (*Polyethylene Glykol*) 6000 Pada Media MS (*Murashige & Skoog*). *El-Hayah* Vol.4, No.2 : 57-65.

- Lee, H.Y., A. Khorolragchaa, Myung-Suk Sun, Young-Joon Kim, Yu-Jin Kim, Woo-Seang Kwon and Deok-Chun Yang. 2013. Plant Regeneration from Anther Culture of *Panax ginseng*. *Korean J. Plant Res.* 26(3): 383-388.
- Lenny, S. 2006. Senyawa terpenoid dan Steroid. *Karya Ilmiah*. Medan: Departemen Kimia Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sumantra Utara.
- Lestari, S. 2013. Pengaruh Jenis Eksplan Dan Konsentrasi IBA (Indole Butyric Acid) Terhadap Pertumbuhan Dan Kadar Meta Sekunder (Stigmasterol dan Sitosterol) Kalus Purwoceng (*Pimpinella alpine* Molk.) pada Media MS. *Skripsi*. Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi UIN Malang.
- Leuner., C and Dressman., J. 2000. *Improving Drug Solubility for Oral Delivery Using Solid Dispersions.*, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 50, 47-60.
- Lifongo, L.L., Simoben C.V., Kang FN., Babiakan S.B. 2014. A Bioactivity Versus Ethnobotanical Survey of Medicinal Plants from Nigeria, West Africa. *Nat. Prod. Bioprospect.*
- Lizawati. 2012. Induksi Kalus Embriogenik Dari Eksplan Tunas Apikal Tanaman Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L.) Dengan Penggunaan 2,4 D DAN TDZ. *Journal Vol. 1, No. 2.*
- Looi, CY., Moharrom B., Payda M., Wong Y.L., Leong K.H., Mohamad K., Arya A., Wong W.F., Mustafa M.R. 2013. Induction of apoptosis in melanoma A375 cells by a chloroform fraction of *Centratherrum anthelminticum* (L.) seeds involves NF.kappaB, p53 and Bcl-2-controlled mitochondrial signaling pathways. *Article of BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13.
- Lutviana, A., Manuhara, S.W. dan Wida, E.S. 2012. *Pengaruh Zat Pengatur Tumbuh Dan NaCl Terhadap Pertumbuhan Kalus Kotiledon Tanaman Bunga Matahari (Helianthus annuus L.)*. Prodi S-1 Biologi, Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga.
- Manuhara, S.W. 2014. Pengaruh Pemberian PEG 6000 Terhadap Pertumbuhan Kalus Dari Eksplan Hipokotil Tanaman *Helianthus annuus* L. *Abstrak Skripsi*. Universitas Airlangga.
- Maraghi, A.M. 1993. *Tafsir Al-Maragi*. Penerjemah: Abubakar, B., Aly H.N., Sitanggal, A.U. Semarang: Toha Putra.

- Mardini, Ucik. 2015. Pengaruh Kombinasi 2,4-D Dan Bap Terhadap Induksi Kalus Eksplan Daun Dan Batang Tanaman Binahong (*Anredera Cordifolia* (Ten.) Steenis) Secara In Vitro. *Artikel Publikasi Ilmiah*. Pendidikan Biologi, Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan, Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Marlina, N., dan Rohayati, E. 2009. Teknik Perbanyakan Mawar dengan Kultur Jaringan. *Nina Marlina dan Euis R*, 14 (2).
- Michel BE, and Kaufmann MR, 1973. The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. *Plant Physiol*. 57:914–916.
- Muhammad, A.J. 2010. *Tafsir Jalalain*. Penerjemah: Junaidi, Najib. Surabaya: Pustaka eLBA Fitrah Mandiri Sejahtera.
- Mulabagal, V. and H. Tsay. 2004. Plant Cell Culture An Alternative and Efficient Source for The Production of Biologically Important Secondary Metabolite. *International Journal of Applied Science and Engineering* 2 (1).
- Muryanti, S. dan Anggarwulan, E., 2005, Pertumbuhan dan Produksi Reserpin Kalus Pule Pandak (*Rauvolfia serpentina* (L.) Bentham ex.Kurz.) pada pemberian Metil Jasmonat secara *in vitro*, *Bioteknologi* 22 (2).
- Najib, Ahmad. 2006. *Ringkasan Materi Kuliah Fitokimia II*. Fakultas Farmasi Universitas Muslim Indonesia. <https://moko31.files.wordpress.com> .
- Nazza, Yusria. 2013. Induksi kalus pegagan (*Centella asiatica*) pada media MS dengan penambahan zat pengatur tubuh 2,4-D yang dikombinasi dengan air kelapa. *Skripsi*. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Nerdy. 2015. In Silico Study of Sesquiterpene Lactone Compounds from South Africa Leaves (*Vernonia amygdalina* Del.) as Antimalarial and Anticancer. *International Journal of PharmTech Research*. Vol.7, No.1.
- Ngatu, N.R., Okajima MK., Hirota R., Suganuma N. 2010. Identification of Bioactive Compounds from *Vernonia amygdalina* leaf and their Anti-allergic activity in patients with atopic/eczema dermatitis. *Article*. Japan Advanced Institute of Science and Technology.
- Njan AA, Adza B, Agaba AG, Byamgaba D, Diaz-Llera S, Bansberg DR. 2008. The analgesic and antiplasmodial activities and toxicology of *Vernonia amygdalina*. *J. Med. Food*, 11: 574-581.

- Perdana, Febie Angelia. 2010. Sintesis dan Karakterisasi Partikel Nano Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> dengan Template PEG-1000. *Artikel Publikasi*. Jurusan Fisika, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, ITS Surabaya.
- Phillips, G.C., J.F. Hubstenberger., and E.E Hansen. 1995. *Plant Regeneration from Callus and Cell Suspension Cultures by Somatic Embryogenesis*. Pg :89-90.
- Pristantho, T.F., Manuhara, S.W., dan Purnobasuki, H. 2011. Pengaruh Stres Kekeringan Terhadap Pertumbuhan Kalus Dari Eksplan Kotiledon Tanaman *Helianthus annuus* Dengan Pemberian Variasi Konsentrasi PEG 6000. *Artikel*. Prodi S-1 Biologi, Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga, Surabaya.
- Qurthubi, Syaikh Imam. 2009. *Tafsir Al Qurthubi*. Penerjemah: Rosyadi, D dan Faturrahman. Jakarta: Pustaka Azzam.
- Rahayu, D.P., Mastuti, R., dan Roosdiana, A. 2009. *Kultur Kalus Sebagai Penghasil Betalain Secara In Vitro*. Malang : Universitas Brawijaya.
- Rahmawati, P.D. 2007. Pengaruh konsentrasi 2,4-D terhadap pertumbuhan dan kandungan senyawa isoflavon daidzein dan genistein dari kalus kedelai (*Glycine max L. Merr.*). *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi UIN, Malang.
- Rao, R. S. 2000. Biotechnological Production of Phytopharmaceuticals. *Journal of Biochemistry Molecular Biology Biophysics*. 4: 73-102.
- Ramawat, K. G. 1999. *Secondary Plant Products in Nature In Biotechnology Secondary Metabolites*. USA : Science Publisher, Inc.
- Riyadi, I., dan Tirtoboma. 2004. Pengaruh 2,4-D Terhadap Induksi Embrio Somatik Kopi Arabika. *Buletin Plasma Nutfah*. Vol.10, No.2.
- Rohmah, S.N. 2007. Penggunaan BAP dan 2,4-D dalam Kultur in vitro Ilesiles (*Amorphophallus muelleri* Blume.). *Tugas Akhir*. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Rosyidah, Muchuriyah, Evie Ratnasari, dan Yuni Sri Rahayu. 2014. Induksi Kalus Daun Melati (*Jasminum sambac*) dengan Penambahan Berbagai Konsentrasi Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D) dan 6-Benzylamino Purine pada Media MS secara In Vitro. *LenteraBio* 3(3).

- Rusdianto. 2009. Pengaruh *polyethylene glycol* (PEG) dan asam absisat (ABA) terhadap perkembangan embrio somatik wortel (*Daucus carota* L). *Electronic Theses and Dissertations (ETD)*, Gadjah Mada University.
- Ruswaningsih, F. 2007. Pengaruh Konsentrasi Ammonium Nitrat dan BAP terhadap Pertumbuhan Eksplan Pucuk *Artemisia annua* L. pada Kultur *In Vitro*. *Skripsi*. Fakultas Pertanian UNS, Surakarta.
- Santoso, U. dan Nursandi, F. 2002. *Kultur Jaringan Tanaman*. Malang : UMM Press.
- Sastrohamidjojo. 1996. *Sintesis Bahan Alam, Cetakan Pertama*. Yogyakarta : Gadjah Mada University Press.
- Shihab, M. Quraish. 1996. *Wawasan Al-Qur'an Tafsir Maudhu'i atas Pelbagai Persoalan Umat*. Bandung: Mizan
- Simanjuntak, P. 2002. Senyawa Fitoaleksin Dari Tumbuhan Obat Indonesia "Dekar", *Caesalpinia major* (Fabaceae). *Jurnal Bahan Alam Indonesia Vol. 1, No. 2*.
- Siti D.H. Hoesen, Witjaksono dan L.A Sukamto, 2008, Induksi Kalus dan Organogenesis Kultur *In Vitro Dendrobium lineale* Rolfe. *Berita Biologi, Vol. 9, No. 3*, Hal. 333-341.
- Sitompul SM, Guritno B. 1995. *Analisis Pertumbuhan Tanaman*. Cetakan Pertama. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Sitorus, E.N., Hastuti, E.D., dan Setiari, N. 2011. Induksi Kalus Binahong (*Basella rubra* L.) secara *In Vitro* pada Media Murashige dan Skoog dengan Konsentrasi Sukrosa yang Berbeda. *BIOMA, 13 (1)*.
- Staba, E.J. 1980. *Plant Tissue Culture as A Source of Biochemichals*. Boca, Raton : CRC Press, Inc.
- Suliansyah, Irfan. 2009. Kultur Jaringan Tanaman. *Artikel*.
- Sulistiyati, M., dan Dameria, H. 2013. *Konsentrasi Aluminium Dalam Media Seleksi Kultur Kalus Padi Pada Pertumbuhan Kalus*, Pusat Aplikasi Isotop dan Radiasi, Batan.
- Suryowinoto, M. 1996. *Pemuliaan Tanaman secara in Vitro*. Yogyakarta: Kanisius.

- Sutjahjo S.H., Kadir A., Mariska I. 2007. Efektivitas Polietilena Glikol Sebagai Bahan Penyeleksi Kalus Nilam Yang Diiradiasi Sinar Gamma Untuk Toleransi Terhadap Cekaman Kekeringan. *Jurnal Ilmu-Ilmu Pertanian Indonesia. Volume 9, No. 1.*
- Syanqithi, Syaikh. 2007. *Tafsir Adhwa'ul Bayan*. Penerjemah: Fakhurrazi. Jakarta: Pustaka Azzam.
- Taiz, L. and Zeiger, E. 1998. *Plant Physiology*. Sinaver Asosiates, Inc Publisher.
- Tim Qisthi. 2007. *Tafsir Muyassar*. Jakarta: Qisthi Press.
- Tuasamu, Y. 2009. Toleransi hotong (*Setaria italic* l. Beauv) pada berbagai cekaman kekeringan: pendekatan anatomi dan fisiologi. Tesis. Sekolah Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Turham, H. 2004. *Callus Inductions and Growth iin transgenic Potato Genotypes. African Journal of Biotechnology* 3(8).
- Vickery M. L. and B. Vickery. 1981. *Secondary Plant Metabolism*. The Macmillan Press LTD. London and Baisngstoke.
- Wetherell, D. F. 1982. *Pengantar Propagasi Tanaman secara in Vitro* (diterjemahkan oleh Koensoemardiyah). Semarang: IKIP Semarang Press.
- Widoretno, Wahyu., Megia, R., dan Sudarsono. 2003. Reaksi Embrio Somatik Kedelai Terhadap Polietilena Glikol dan Penggunaannya untuk Seleksi In Vitro terhadap Cekaman Kekeringan. *Hayati. 10 (4):* 134-139.
- Yokota, T., Tutumi, N., and Takahasi, K. 1999. Growth Rate Estimation of in Vitro Primarily Induced Carrot Callus by a Fractal Based Model. *Biochemical Engineering Journal. 3:* 231-234.
- Yulia, E. N.S., Budipramana, L. S., dan Ratnasari, E. 2012. Induksi dan Pertumbuhan Kalus Batang Melati (*Jasminum sambac*) pada Media MS dengan Penambahan Giberelin. *Lentera-Bio. Vol. 1 (1).*
- Yusnita. 2003. *Kultur Jaringan (Cara Memperbanyak tanaman secara efisien)*. Jakarta: Agromedia Pustaka.
- Yuwono, T. 2006. *Bioteknologi Pertanian*. Yogyakarta : UGM Press.

- Zulhilmi, S dan Netty W.S. 2012. Pertumbuhan dan Uji Kualitatif Kandungan Metabolit Sekunder Kalus Gatang (*Spilanthes acmella* Murr.) dengan Penambahan PEG untuk Menginduksi Cekaman Kekeringan. *Jurnal Biologi Universitas Andalas 1(1)*: 1-8.
- Zulkarnain. 2009. *Kultur Jaringan Tanaman: Solusi Perbanyak Tanaman Budidaya*, Jakarta: Bumi Aksara.



## LAMPIRAN

### Lampiran 1. Komposisi Bahan Kimia pada Media MS (mg/l)

Unsur Makro	(mg/l)	Unsur Mikro	(mg/l)	Vitamin	(mg/l)
KNO <sub>3</sub>	1900	MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	16,9	Myo-inositol	100
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8,6	Tiamin HCl	0,1
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	Piridoxin HCl	0,5
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	KI	0,83	Asam nicotin	0,5
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	332,2	CuSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,025	Gliasin	2
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	-	NaM <sub>0</sub> O <sub>3</sub>	-	Biotin	-
KCl	-	NaM <sub>0</sub> O <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,25	<b>Karbohidrat</b>	<b>(mg/l)</b>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,25	Sukrosa	3000
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	370	FeSO <sub>4</sub> ·6H <sub>2</sub> O	27,8	Agar-agar	8000
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	-	pH	5.6-5.8
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	-	Na <sub>2</sub> EDTA	37,7		

### Lampiran 2. Perhitungan Konsentrasi PEG 6000

#### a) Perhitungan larutan stok PEG 6000 dalam 100 ppm

Larutan stok dibuat 100 ppm dalam 100 ml aquades dengan perhitungan:

$$\text{Larutan Stok PEG 100 ppm} = \frac{100 \text{ mg}}{1 \text{ L}} = \frac{100 \text{ mg}}{1000 \text{ ml}} = \frac{10 \text{ mg}}{100 \text{ ml}}$$

Dari perhitungan tersebut maka untuk membuat larutan stok PEG 100 ppm dalam 100 ml aquades, dibutuhkan PEG 10 mg.

#### b) Perhitungan Pengambilan Larutan Stok

Rumus :  $V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$

Keterangan :  $V_1$  = Volume yang akan dibua

$M_1$  = Banyaknya kebutuhan senyawa dalam media MS

$V_2$  = Volume larutan stok yang akan diambil

$M_2$  = Banyaknya senyawa dalam larutan stok

1) Konsentrasi PEG 5 mg/L (5 ppm)

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$1000 \text{ ml} \times 15 \text{ ppm} = V_2 \times 100 \text{ ppm}$$

$$15000 = V_2 \times 100 \text{ ppm}$$

$$V_2 = 15000/100 = 50 \text{ ml}$$

2) Konsentrasi PEG 15 mg/L (15 ppm)

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$1000 \text{ ml} \times 15 \text{ ppm} = V_2 \times 100 \text{ ppm}$$

$$15000 = V_2 \times 100 \text{ ppm}$$

$$V_2 = 15000/100 = 150 \text{ ml}$$

3) Konsentrasi PEG 25 mg/L (25 ppm)

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$1000 \text{ ml} \times 25 \text{ ppm} = V_2 \times 100 \text{ ppm}$$

$$25000 = V_2 \times 100 \text{ ppm}$$

$$V_2 = 25000/100 = 250 \text{ ml}$$

### Lampiran 3. Perhitungan Persentase Eksplan Berkalus

1. Kalus dengan perlakuan PEG 0 mg/l

Diketahui: Eksplan yang ditanam = 15

Kalus yang terbentuk dari eksplan = 7

Ditanya : a.  $\Sigma$  kalus yang terbentuk per eksplan?

b. % eksplan membentuk kalus?

Jawab :

a.  $\Sigma$  kalus yang terbentuk per eksplan =  $\frac{\Sigma \text{ kalus yang terbentuk}}{\Sigma \text{ ekplan yang ditanam}}$

b. % eksplan membentuk kalus =  $\frac{\Sigma \text{ kalus yang terbentuk}}{\Sigma \text{ ekplan yang ditanam}} \times 100 \%$

- Ulangan 1 =  $\frac{2}{3} = 0.67 \times 100 \% = 67 \%$
- Ulangan 2 =  $\frac{2}{3} = 0.67 \times 100 \% = 67 \%$
- Ulangan 3 =  $\frac{1}{3} = 0.33 \times 100 \% = 33 \%$
- Ulangan 4 =  $\frac{1}{3} = 0.33 \times 100 \% = 33 \%$
- Ulangan 5 =  $\frac{1}{3} = 0.33 \times 100 \% = 33 \%$

2. Kalus dengan perlakuan PEG 5 mg/l

Diketahui: Eksplan yang ditanam = 15

Kalus yang terbentuk dari eksplan = 11

Ditanya : a.  $\Sigma$  kalus yang terbentuk per eksplan?

b. % eksplan membentuk kalus?

Jawab :

$$a. \Sigma \text{ kalus yang terbentuk per eksplan} = \frac{\Sigma \text{ kalus yang terbentuk}}{\Sigma \text{ ekplan yang ditanam}}$$

$$b. \% \text{ eksplan membentuk kalus} = \frac{\Sigma \text{ kalus yang terbentuk}}{\Sigma \text{ ekplan yang ditanam}} \times 100 \%$$

- Ulangan 1 =  $\frac{2}{3} = 0.67 \times 100 \% = 67 \%$
- Ulangan 2 =  $\frac{2}{3} = 0.67 \times 100 \% = 67 \%$
- Ulangan 3 =  $\frac{3}{3} = 1.00 \times 100 \% = 100 \%$
- Ulangan 4 =  $\frac{2}{3} = 0.67 \times 100 \% = 67 \%$
- Ulangan 5 =  $\frac{2}{3} = 0.67 \times 100 \% = 67 \%$

3. Kalus dengan perlakuan PEG 15 mg/l

Diketahui: Eksplan yang ditanam = 15

Kalus yang terbentuk dari eksplan = 14

Ditanya : a.  $\Sigma$  kalus yang terbentuk per eksplan?

b. % eksplan membentuk kalus?

Jawab :

$$a. \Sigma \text{ kalus yang terbentuk per eksplan} = \frac{\Sigma \text{ kalus yang terbentuk}}{\Sigma \text{ ekplan yang ditanam}}$$

$$b. \% \text{ eksplan membentuk kalus} = \frac{\Sigma \text{ kalus yang terbentuk}}{\Sigma \text{ ekplan yang ditanam}} \times 100 \%$$

- Ulangan 1 =  $\frac{3}{3} = 1.00 \times 100 \% = 100 \%$

- Ulangan 2 =  $\frac{3}{3} = 1.00 \times 100 \% = 100 \%$

- Ulangan 3 =  $\frac{3}{3} = 1.00 \times 100 \% = 100 \%$

- Ulangan 4 =  $\frac{3}{3} = 1.00 \times 100 \% = 100 \%$

- Ulangan 5 =  $\frac{2}{3} = 0.67 \times 100 \% = 67 \%$

4. Kalus dengan perlakuan PEG 25 mg/l

Diketahui: Eksplan yang ditanam = 20

Kalus yang terbentuk dari eksplan = 8

Ditanya : a.  $\Sigma$  kalus yang terbentuk per eksplan?

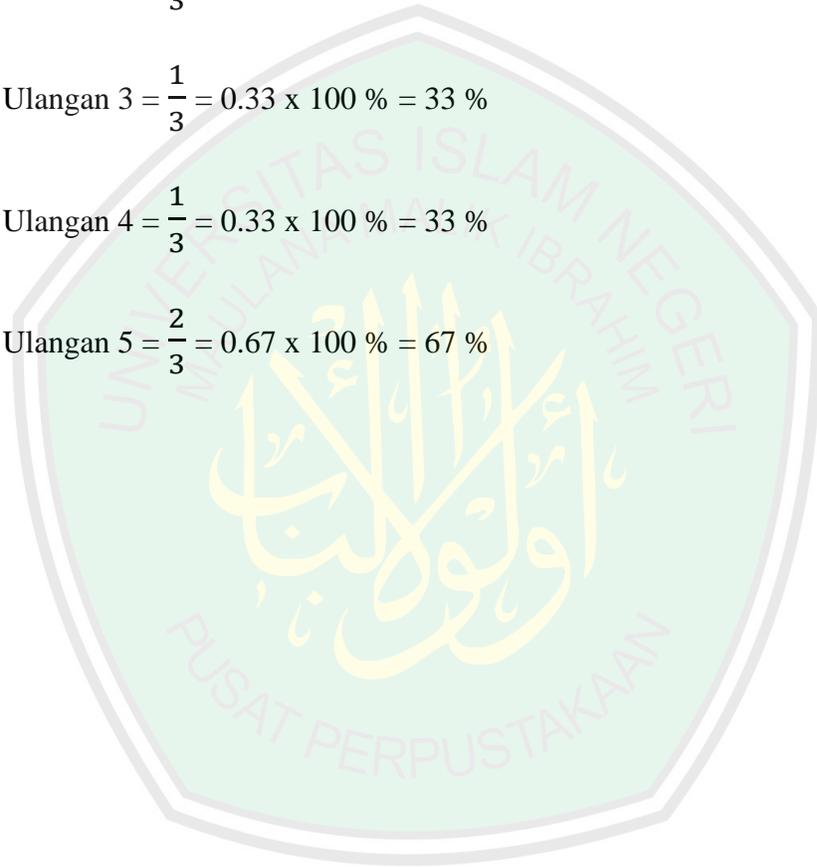
b. % eksplan membentuk kalus?

Jawab :

$$a. \Sigma \text{ kalus yang terbentuk per eksplan} = \frac{\Sigma \text{ kalus yang terbentuk}}{\Sigma \text{ ekplan yang ditanam}}$$

b. % eksplan membentuk kalus =  $\frac{\Sigma \text{ kalus yang terbentuk}}{\Sigma \text{ ekplan yang ditanam}} \times 100 \%$

- Ulangan 1 =  $\frac{2}{3} = 0.67 \times 100 \% = 67 \%$
- Ulangan 2 =  $\frac{2}{3} = 0.67 \times 100 \% = 67 \%$
- Ulangan 3 =  $\frac{1}{3} = 0.33 \times 100 \% = 33 \%$
- Ulangan 4 =  $\frac{1}{3} = 0.33 \times 100 \% = 33 \%$
- Ulangan 5 =  $\frac{2}{3} = 0.67 \times 100 \% = 67 \%$



**Lampiran 4. Warna Kalus pada Media PEG 6000**

Perlakuan	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Ulangan 4	Ulangan 5
PEG 0 mg/l	Hijau kecoklatan	Hijau kecoklatan	Hijau kecoklatan	Hijau kecoklatan	Hijau kecoklatan
PEG 5 mg/l	Hijau keputihan	Hijau keputihan	Hijau keputihan	Hijau keputihan	Hijau keputihan
PEG 15 mg/l	Hijau keputihan	Hijau keputihan	Hijau keputihan	Hijau keputihan	Hijau keputihan
PEG 25 mg/l	Hijau kecoklatan	Hijau kecoklatan	Hijau kecoklatan	Hijau kecoklatan	Hijau kecoklatan

**Lampiran 5. Tekstur Kalus pada Media PEG 6000**

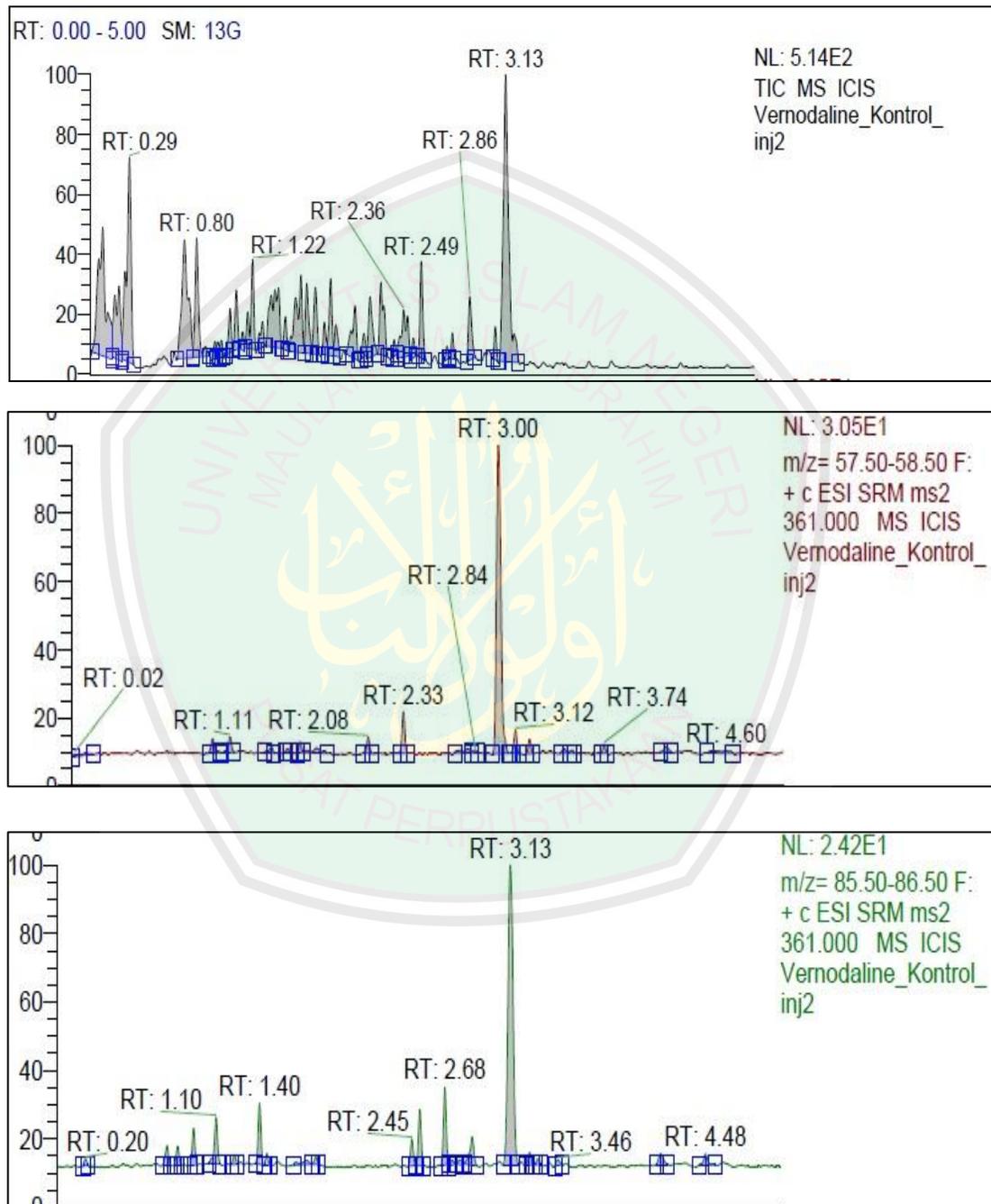
Perlak.	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Ulangan 4	Ulangan 5
PEG 0	Remah	Remah	Remah	Remah	Remah
PEG 5	Intermediet	Intermediet	Intermediet	Intermediet	Intermediet
PEG 15	Intermediet	Intermediet	Intermediet	Intermediet	Intermediet
PEG 25	Remah	Remah	Remah	Remah	Remah

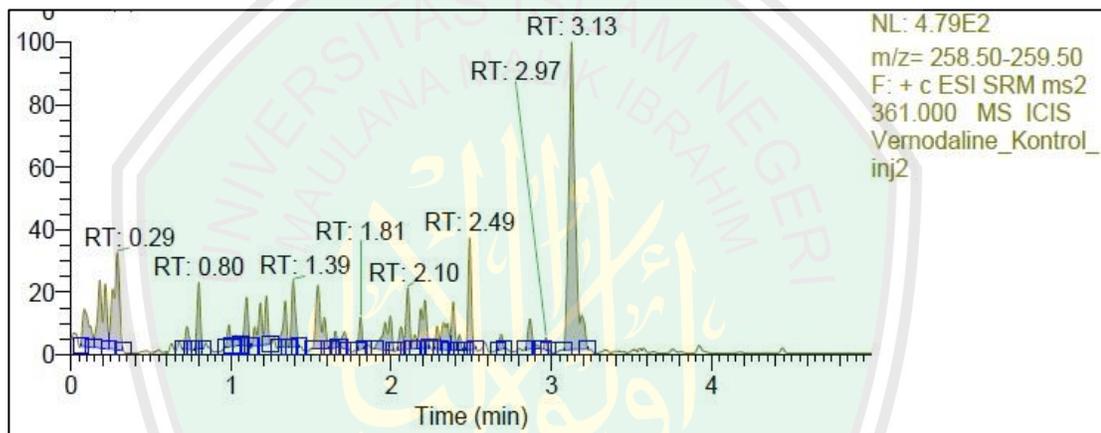
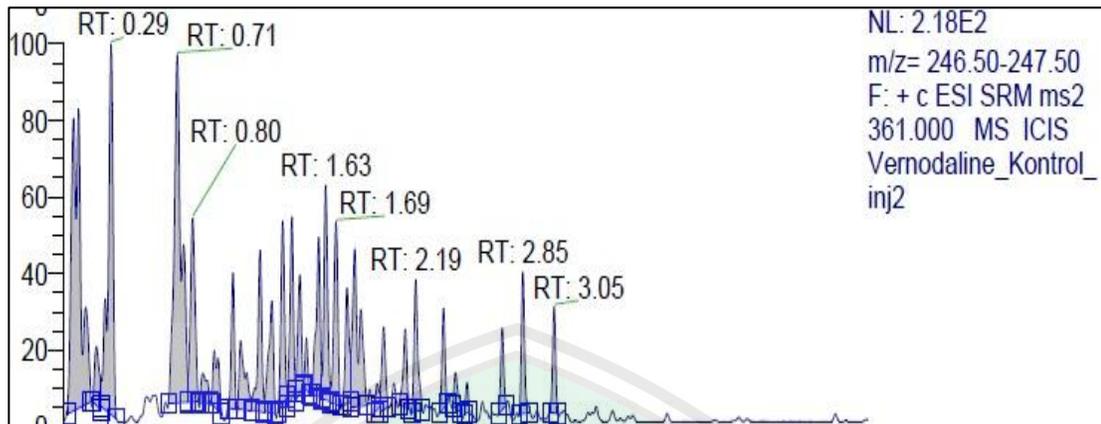
**Lampiran 6. Hari Muncul Kalus**

Perlak.	Hari ke-														
	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
PEG 0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
PEG 5	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PEG 15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PEG 25	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+

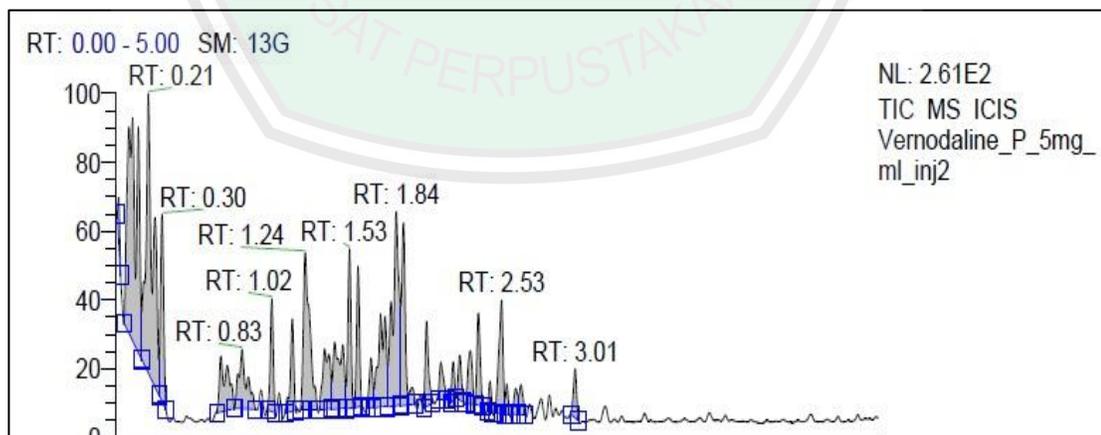
**Lampiran 7. Berat Kalus**

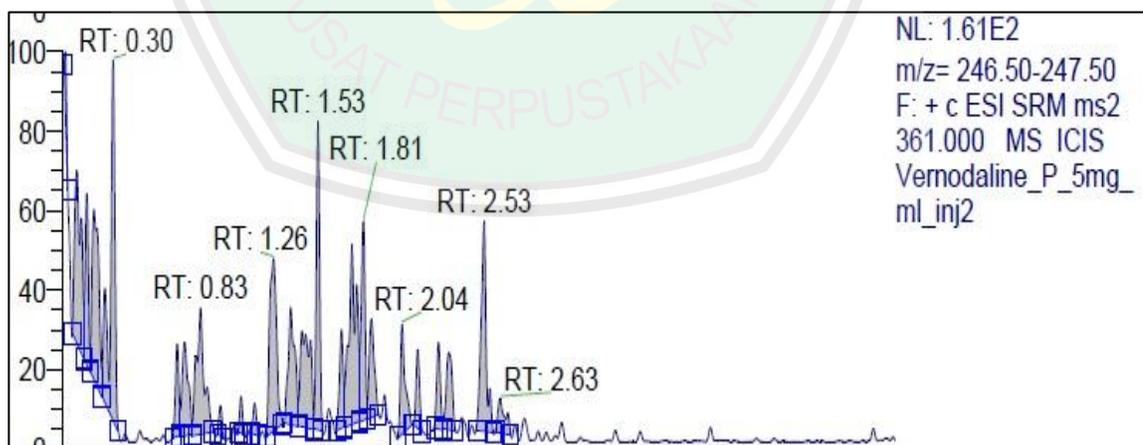
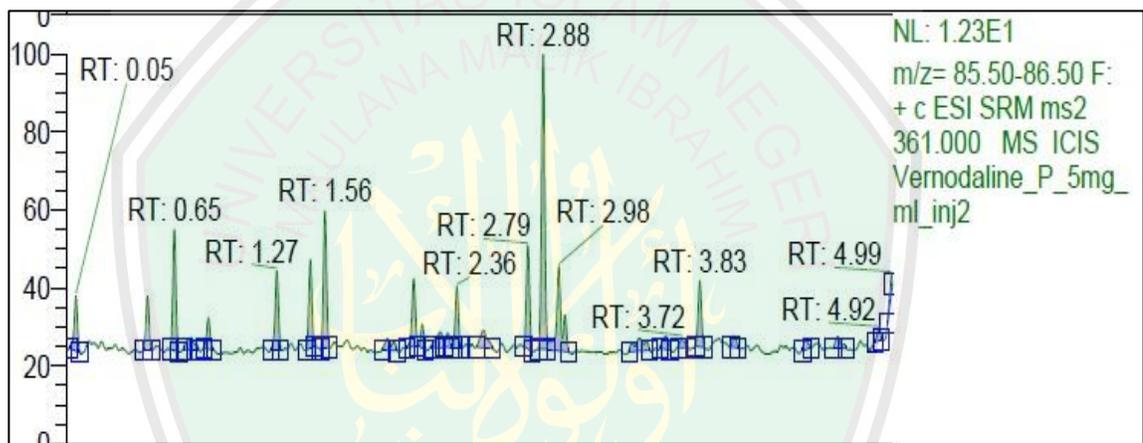
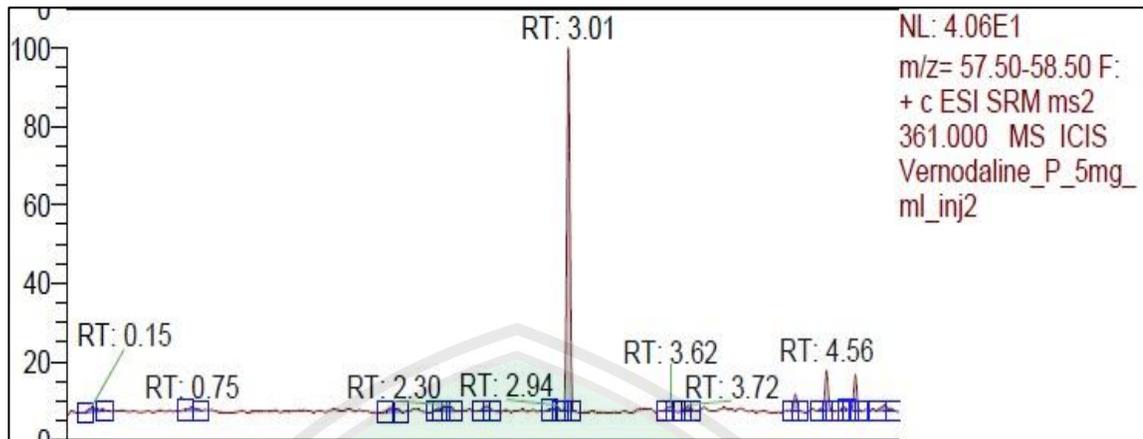
Perlakuan	Ulangan					Total	Rata-Rata
	1	2	3	4	5		
PEG 0	0.005	0.0075	0.0025	0.005	0.0015	0.022	0.004
PEG 5	0.17	0.11	0.28	0.05	0.08	0.69	0.14
PEG 15	0.17	0.28	0.08	0.22	0.28	1.03	0.21
PEG 25	0.11	0.11	0.08	0.05	0.02	0.37	0.07

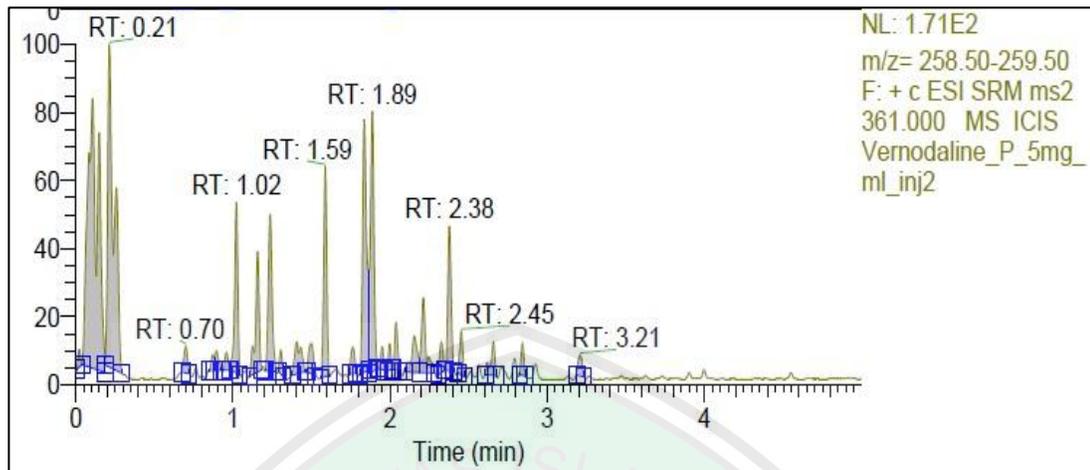
**Lampiran 8. Gambar Hasil Uji Kualitatif Vernodalin menggunakan LC-MS/MS****a) Kontrol (PEG 0 mg/l)**



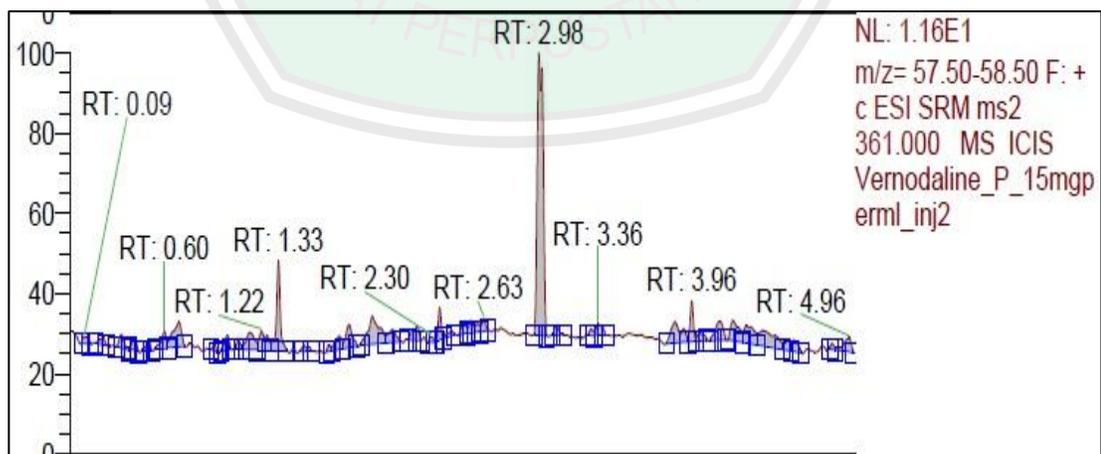
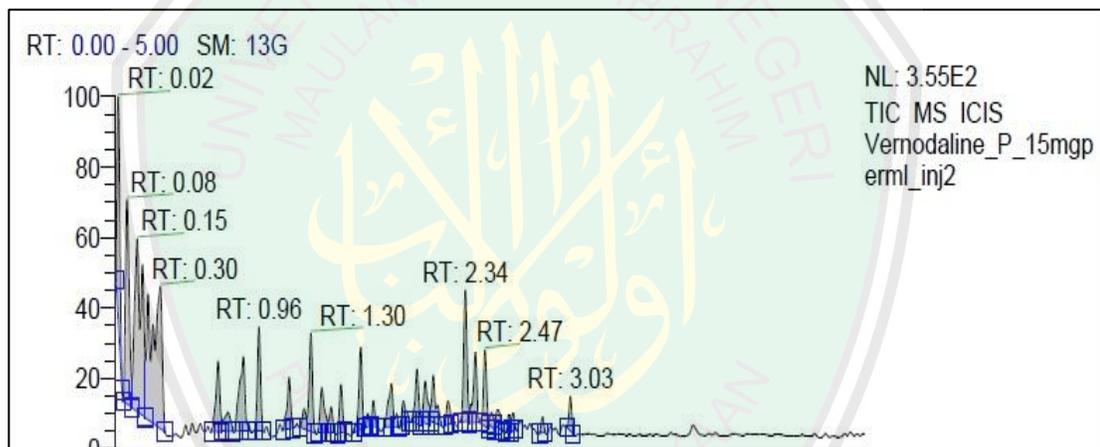
**b) PEG 5 mg/l**

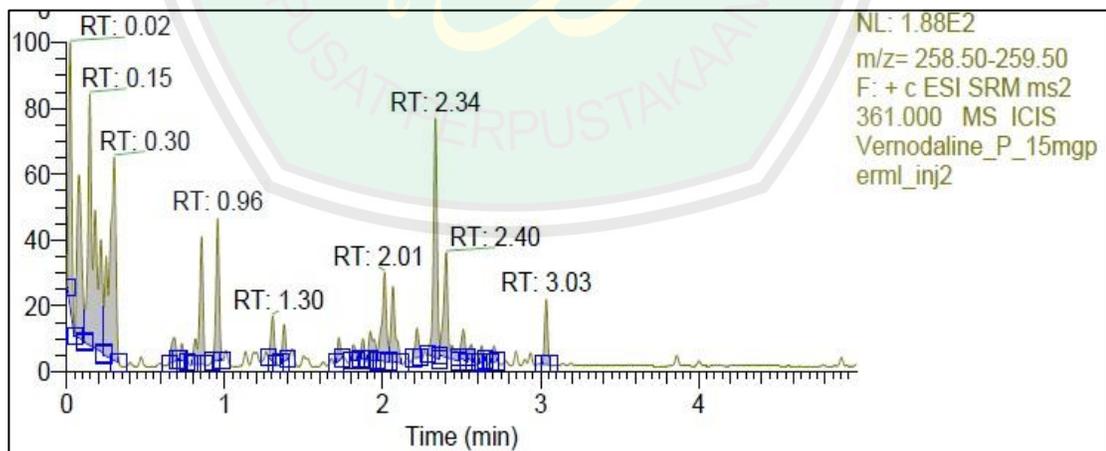
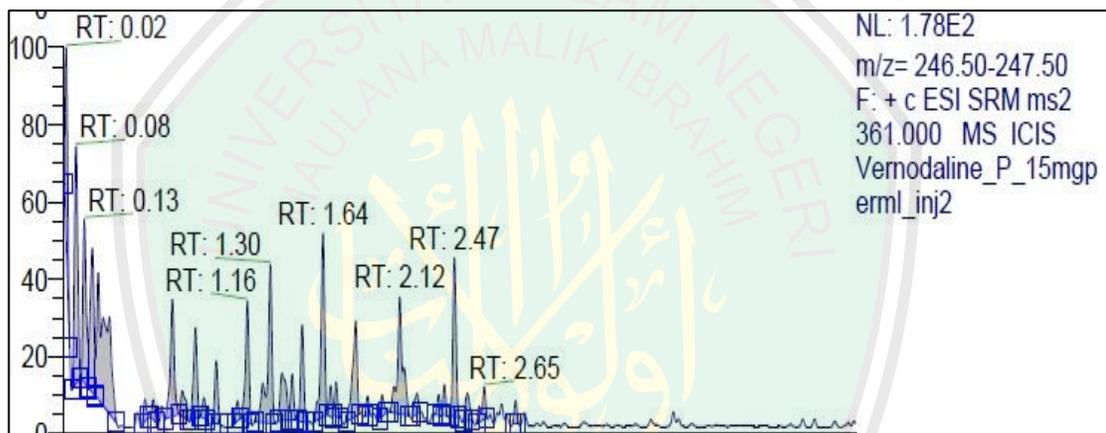
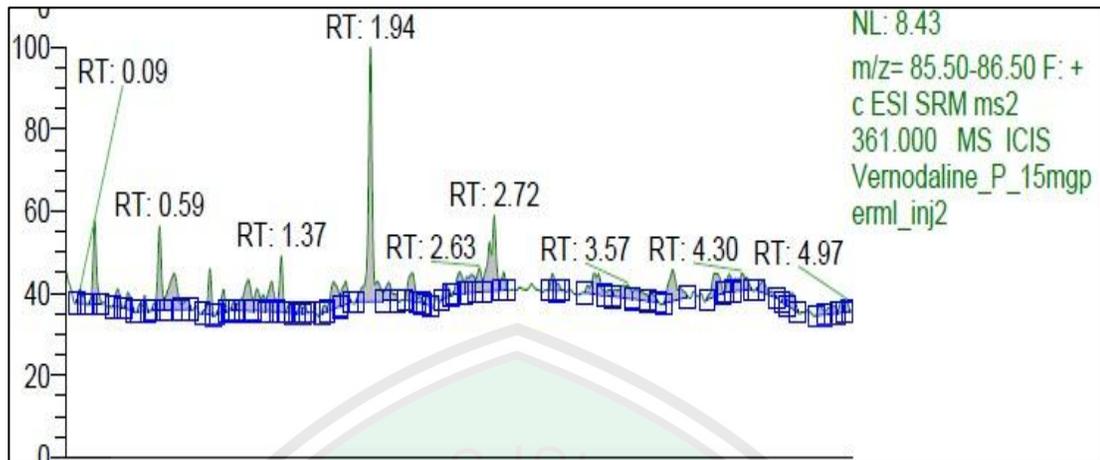




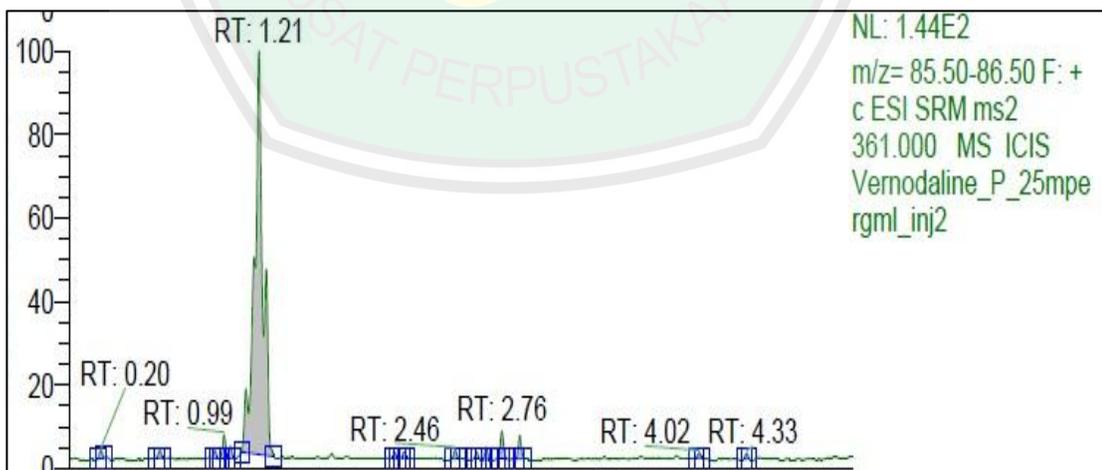
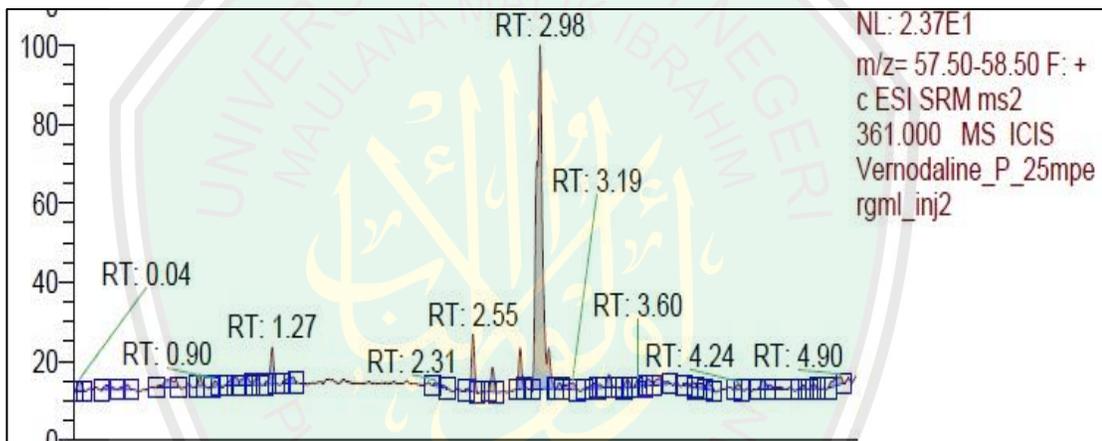
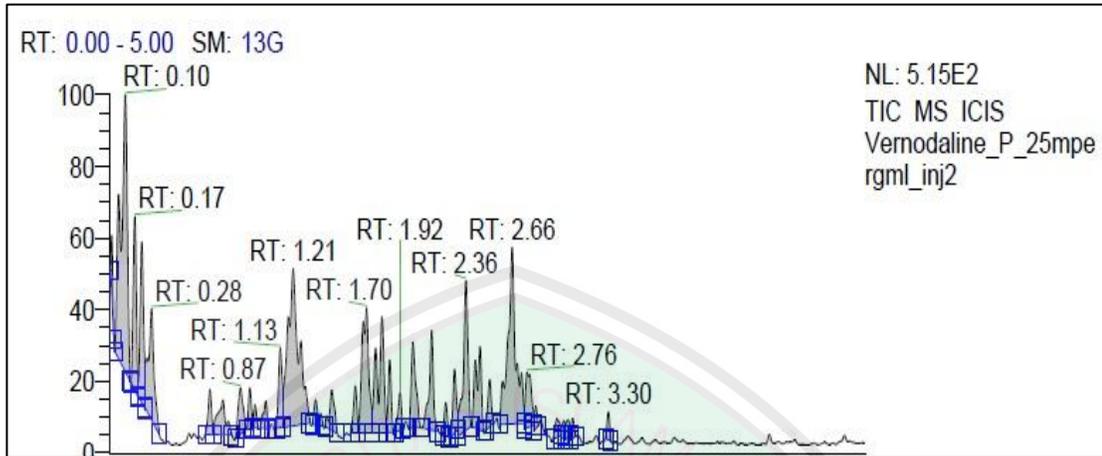


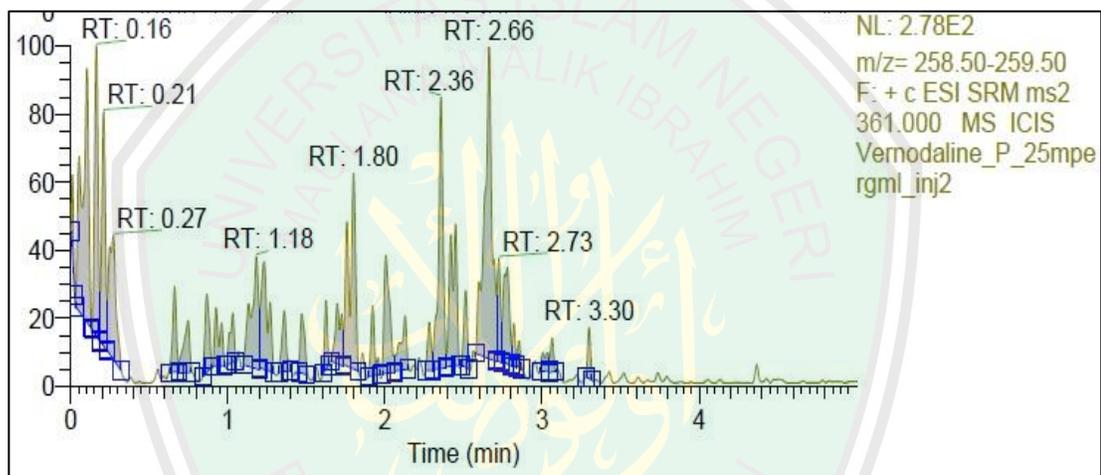
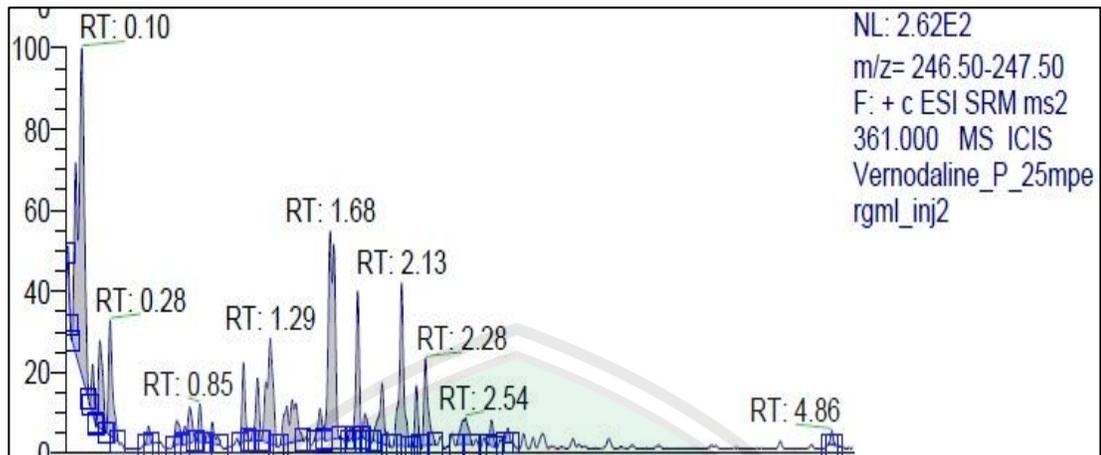
c) PEG 15 mg/l





## d) PEG 25 mg/l





**Lampiran 9. Alat-alat Penelitian**

Gambar 1. Gelas Beker



Gambar 2. Timbangan Analitik



Gambar 3. Oven



Gambar 4. Autoklaf



Gambar 5. Rak Inkubasi



Gambar 6. Gelas Ukur

Gambar 7. Cawan Petri,  
Scalpel, Pinset

Gambar 8. Bunsen



Gambar 9. Botol Sprai

### Lampiran 10. Bahan-bahan Penelitian



Gambar 1. Media MS (Murashige and Skoog)



Gambar 2. Fungisida



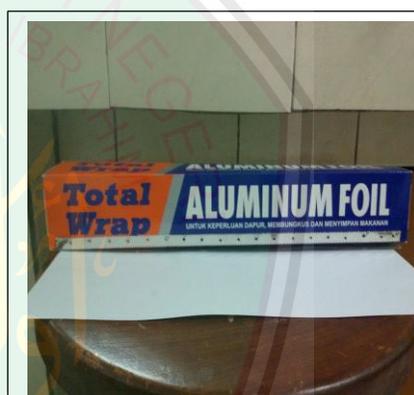
Gambar 3. Gula Pasir



Gambar 4. Aquades



Gambar 5. Alkohol 70%, Alkohol 96%, Spirtus, Bayclin



Gambar 6. Aluminum Foil



Gambar 7. Plastik Wrap



**KEMENTERIAN AGAMA RI**  
**UNIVERSITAS ISLAM NEGERI**  
**MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG**  
**FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI**  
**Jl. Gajayana No. 50 Dinoyo Malang Telp. /Fax. (0341) 558933**

**BUKTI KONSULTASI SKRIPSI**

Nama : Agustin Maulina Arianti  
 NIM : 11620048  
 Fakultas/Jurusan : Sains dan Teknologi/Biologi  
 Judul Skripsi : Pengaruh Berbagai Konsentrasi PEG (*Polyethylen Glycol*) 6000 Terhadap Kualitas Dan Kuantitas Kalus Serta Uji Kualitatif Metabolit Sekunder Vernodalin Pada Kalus Daun Afrika (*Vernonia amygdalina*).  
 Pembimbing I : Dr. Retno Susilowati, M.Si

No.	Tanggal	Hal	Tanda Tangan
1.	5 Mei 2015	Pengajuan Judul Skripsi	1.
2.	19 Mei 2015	Konsultasi BAB I,II dan III	2.
3.	9 Juni 2015	Revisi BAB I, II dan II	3.
4.	16 Juni 2015	Seminar Proposal	4.
5.	29 Oktober 2015	Konsultasi BAB IV dan V	5.
6.	2 November 2015	Konsultasi BAB I, II, III, IV dan V	6.
7.	3 November 2015	Revisi BAB I, II, III, IV dan V	7.
8.	18 November 2015	Acc BAB I, II, III, IV dan IV	8.

Mengetahui,  
 Ketua Jurusan Biologi

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



**KEMENTERIAN AGAMA RI**  
**UNIVERSITAS ISLAM NEGERI**  
**MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG**  
**FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI**  
**Jl. Gajayana No. 50 Dinoyo Malang Telp. /Fax. (0341) 558933**

**BUKTI KONSULTASI SKRIPSI**

Nama : Agustin Maulina Arianti  
 NIM : 11620048  
 Fakultas/Jurusan : Sains dan Teknologi/Biologi  
 Judul Skripsi : Pengaruh Berbagai Konsentrasi PEG (*Polyethylen Glycol*) 6000 Terhadap Kualitas Dan Kuantitas Kalus Serta Uji Kualitatif Metabolit Sekunder Vernodalin Pada Kalus Daun Afrika (*Vernonia amygdalina*).  
 Pembimbing II : Umayyatus Syarifah, M.A

No.	Tanggal	Hal	Tanda Tangan
1.	7 Agustus 2015	Konsultasi Agama BAB I	1. /
2.	15 Agustus 2015	Revisi Agama BAB I	2. /
3.	6 Oktober 2015	Konsultasi Agama BAB IV	3. /
4.	12 Oktober 2015	Revisi Agama BAB IV	4. /
5.	4 November 2015	ACC BAB I dan BAB IV	5. /
6.	8 November 2015	ACC Keseluruhan	6. /

Mengetahui,  
 Ketua Jurusan Biologi

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