

Anis Mahmuda, 2018, **Pengaruh 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) terhadap Induksi Kalus dan Profil Metabolit Sekunder Kultur Kalus Sirih Hitam (*Piper betle* L. var. *Nigra*)**, Skripsi ini dibawah bimbingan Dr. Junairiah, S.Si, M.Kes. dan Prof. Dr. Y. Sri Wulan Manuhara, M.Si., Departemen Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga, Surabaya.

ABSTRAK

Sirih Hitam (*Piper betle* L. var. *Nigra*) merupakan tanaman hias yang juga berpotensi sebagai sumber bahan obat-obatan. Sirih hitam dapat dijadikan alternatif sebagai antiseptik yang aman. Bagian tumbuhan yang banyak dimanfaatkan sebagai obat adalah bagian daun karena pada daun sirih hitam mengandung minyak atsiri, flavonoid, triterpenoid, steroid, alkaloid, dan saponin. Kultur *in vitro* dapat digunakan untuk memproduksi metabolit sekunder dengan penggunaan media kultur dan pemberian zat pengatur tumbuh yang tepat. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh konsentrasi 2,4-D terhadap waktu induksi, persentase, berat basah, berat kering, morfologi, dan profil metabolit sekunder kalus sirih hitam. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris dengan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 6 perlakuan konsentrasi dan setiap perlakuan diulang 12 kali. Media yang digunakan adalah media MS yang ditambahkan beberapa konsentrasi zat pengatur tumbuh 2,4-D (0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; dan 2,5 mg/L). Setelah diperoleh kalus, dilanjutkan dengan analisis kandungan senyawa menggunakan skrining fitokimia. Data yang diperoleh dianalisis secara kualitatif dan kuantitatif. Data kualitatif didapatkan dari deskripsi morfologi kalus dan hasil analisis kandungan metabolit sekunder. Data kuantitatif didapatkan dari waktu induksi, persentase, berat basah dan berat kering kalus selanjutnya dianalisis secara statistik menggunakan uji Mann-Whitney dengan nilai signifikansi ($\alpha=0,05$). Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa pada perlakuan 2,4-D 2,5 mg/L mampu menginduksi kalus lebih cepat dari perlakuan yang lain dengan rerata waktu induksi kalus $14,83 \pm 1,9462$ hari setelah tanam. Perlakuan 2,4-D 1,5 mg/L menghasilkan rerata berat basah dan berat kering kalus paling tinggi yaitu 0,8951 gram dan 0,0470 gram. Morfologi kalus dengan tekstur remah dan berwarna putih kekuningan dihasilkan pada perlakuan 2,4-D 1,5 mg/L. Hasil perlakuan konsentrasi 2,4-D 1,5 mg/L terhadap profil metabolit sekunder yang dianalisis dengan skrining fitokimia mengandung senyawa flavonoid dan pada konsentrasi 2,4-D (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; dan 2,5 mg/L) mengandung senyawa terpenoid.

Kata kunci: 2,4-D, Piper betle L. var. Nigra, metabolit sekunder, skrining fitokimia.

Anis Mahmuda, 2018, **The Effect of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) on Callus Induction and Secondary Metabolite Profile Callus Culture of Black Betel (*Piper betle* L. var. Nigra)**, This script is guided by Dr. Junairiah, S.Si, M.Kes. and Prof. Dr. Y. Sri Wulan Manuhara, M.Si., Department of Biology, Faculty of Science and Technology, Airlangga University, Surabaya.

ABSTRACT

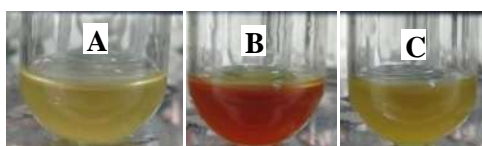
Piper betle L. var. Nigra is an ornamental plant which is also a potential sources of medicine. *Piper betle* L. var. Nigra can be used as an alternative safe antiseptic. The part of the plant that is widely used medicine is part of the leaf because *Piper betle* L. var. Nigra leaves contain essential oils, flavonoids, triterpenoids, steroids, alkaloids, and saponins. In vitro culture can be used to produce secondary metabolites with use of culture medium and giving proper growth regulator. The purpose of this research was to know the effect concentrations of 2,4-D on induction time, percentage, wet weight, dry weight, morphology, and secondary metabolite profile callus of *Piper betle* L. var. Nigra. This research was a laboratory experimental research with complete randomized design method with 6 concentration treatments and each treatment was repeated 12 times. Media used on callus induction was MS medium with addition of several concentration of growth regulator 2,4-D (0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; and 2,5 mg/L). After the culture were obtained, the compounds of the culture were analyzed using phytochemical screening. The data obtained were analyzed qualitatively and quantitatively. Qualitative data obtained from the description of callus morphology and the results of the analysis of secondary metabolite content. Quantitative data obtained from induction time, percentage, wet weight and dry weight of callus were than statistically analyzed using Mann-Whitney test with significance value ($\alpha=0,05$). The results showed that the treatment 2,4-D 2,5 mg/L was able to induce callus faster than other treatments with a mean time of $14,83 \pm 1,9462$ days after planting. The treatment of 2,4-D 1,5 mg/L resulted in the highest average wet weight and dry weight of callus 0,8951 gram and 0,0470 gram. Callus morphology with textured friable and yellowish white color was produced in 2,4-D 1,5 mg/L treatment. The results of the treatment of 2,4-D concentration 1,5 mg/L on the profile of secondary metabolites analyzed by phytochemical screening contained flavonoids compounds and at concentration of 2,4-D (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; and 2,5 mg/L) terpenoids.

Key words: 2,4-D, Piper betle L. var. Nigra, secondary metabolite, phytochemical screening



Gambar 4.4 Hasil pengujian skrining fitokimia kelompok senyawa alkaloid

Keterangan : Hasil negatif pengujian skrining fitokimia senyawa alkaloid ekstrak kalus sirih hitam konsentrasi 2,4-D 1,0 mg/L; **A.** Pereaksi Mayer (tidak terbentuk endapan putih); **B.** Pereaksi Wagner (tidak terbentuk endapan cokelat kemerahan); **C.** Pereaksi Dragendorff (tidak terbentuk endapan cokelat kemerahan)



Gambar 4.5 Hasil pengujian skrining fitokimia kelompok senyawa alkaloid

Keterangan : Hasil negatif pengujian skrining fitokimia senyawa alkaloid ekstrak kalus sirih hitam konsentrasi 2,4-D 1,5 mg/L; **A.** Pereaksi Mayer (tidak terbentuk endapan putih); **B.** Pereaksi Wagner (tidak terbentuk endapan cokelat kemerahan); **C.** Pereaksi Dragendorff (tidak terbentuk endapan cokelat kemerahan)



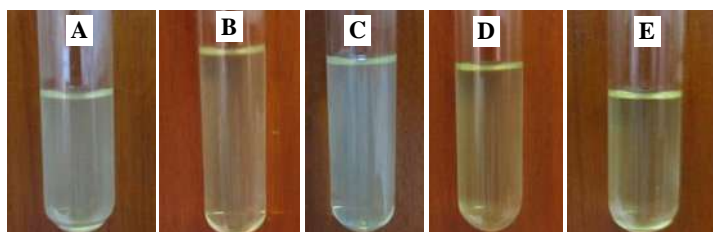
Gambar 4.6 Hasil pengujian skrining fitokimia kelompok senyawa alkaloid

Keterangan : Hasil negatif pengujian skrining fitokimia senyawa alkaloid ekstrak kalus sirih hitam konsentrasi 2,4-D 2,0 mg/L; **A.** Pereaksi Mayer (tidak terbentuk endapan putih); **B.** Pereaksi Wagner (tidak terbentuk endapan cokelat kemerahan); **C.** Pereaksi Dragendorff (tidak terbentuk endapan cokelat kemerahan)



Gambar 4.7 Hasil pengujian skrining fitokimia kelompok senyawa alkaloid

Keterangan : Hasil negatif pengujian skrining fitokimia senyawa alkaloid ekstrak kalus sirih hitam konsentrasi 2,4-D 2,5 mg/L; **A.** Pereaksi Mayer (tidak terbentuk endapan putih); **B.** Pereaksi Wagner (tidak terbentuk endapan cokelat kemerahan); **C.** Pereaksi Dragendorff (tidak terbentuk endapan cokelat kemerahan)



Gambar 4.8 Hasil pengujian skrining fitokimia kelompok senyawa saponin

Keterangan: Hasil negatif (tidak terbentuk busa) pengujian skrining fitokimia senyawa saponin ekstrak kalus sirih hitam; **A.** Konsentrasi 2,4-D 0,5 mg/L; **B.** Konsentrasi 2,4-D 1,0 mg/L; **C.** Konsentrasi 2,4-D 1,5 mg/L; **D.** Konsentrasi 2,4-D 2,0 mg/L; **E.** Konsentrasi 2,4-D 2,5 mg/L

4.2 Pembahasan

4.2.1 Pengaruh pemberian zat pengatur tumbuh 2,4-D berbagai konsentrasi terhadap lama waktu induksi kalus dan persentase eksplan membentuk kalus daun sirih hitam

Pemberian zat pengatur tumbuh 2,4-D pada eksplan daun sirih hitam memberikan respon yang bervariasi pada masing-masing perlakuan. Hasil ini ditunjukkan dengan perbedaan lama waktu eksplan menginduksi kalus. Kalus merupakan proliferasi massa sel yang belum terdiferensiasi dan terdiri dari sel yang

tidak teratur. Kultur kalus merupakan kultur sekumpulan sel yang tidak terorganisir yang berasal dari berbagai jaringan tumbuhan (Budiyanti, 2002).

Kultur kalus digunakan untuk memperoleh kalus dari eksplan yang ditumbuhkan dalam lingkungan terkendali. Pembentukan kalus adalah menginduksi dari bagian tanaman tertentu dengan memberikan zat pengatur tumbuh (Rohmah, 2007). Salah satu indikator adanya pertumbuhan dalam kultur *in vitro* adalah munculnya kalus pada eksplan.

Pada penelitian ini, kalus pertama kali terbentuk pada sayatan eksplan yang kontak dengan media yang diawali dengan pembengkakan pada eksplan kemudian sayatan eksplan melengkung dan bergelombang. Kalus yang dihasilkan melalui kultur *in vitro* terbentuk karena adanya pelukaan pada jaringan dan respon terhadap zat pengatur tumbuh. Kalus muncul pada bagian yang dilukai karena adanya rangsangan dari jaringan pada eksplan untuk menutupi bagian yang luka. Pembelahan sel yang mengarah pada terbentuknya kalus terjadi dari adanya respon terhadap luka dan suplai hormon alamiah atau hormon buatan dari luar ke dalam eksplan (George dan Sherrington, 2007).

Kultur kalus eksplan daun sirih hitam pada media MS tanpa penambahan zat pengatur tumbuh tidak dapat menginduksi terbentuknya kalus. Penambahan zat pengatur tumbuh pada media MS dapat menginduksi kalus pada semua perlakuan.

Pada tabel 4.1 menunjukkan bahwa induksi kalus tercepat terjadi pada media MS dengan penambahan zat pengatur tumbuh 2,4-D 2,5 mg/L dengan rerata lama waktu induksi kalus $14,83 \pm 1,9462$ hari, sedangkan induksi kalus paling lama

terjadi pada perlakuan konsentrasi zat pengatur tumbuh 2,4-D 1,0 mg/L yaitu $20,67 \pm 0,7784$ hari. Berdasarkan hasil analisis menggunakan SPSS, pada tabel 4.1 dapat diketahui bahwa pemberian 2,4-D dengan konsentrasi 2,5 mg/L menginduksi kalus lebih cepat dibandingkan dengan perlakuan lainnya. Hasil ini tidak berbeda nyata dengan pemberian 2,4-D dengan konsentrasi 1,5 mg/L, tetapi berbeda nyata dengan perlakuan lainnya. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian 2,4-D dengan konsentrasi 1,5 mg/L maupun 2,5 mg/L merupakan konsentrasi optimal untuk pembentukan kalus pada eksplan daun sirih hitam.

Pemilihan zat pengatur tumbuh merupakan salah satu faktor yang sangat menentukan pembentukan kalus tanaman yang dikulturkan. 2,4-D merupakan zat pengatur tumbuh yang paling sering digunakan pada kultur kalus karena aktivitasnya yang kuat untuk memacu proses dediferensiasi sel, menekan organogenesis serta menjaga pertumbuhan kalus. Apabila dibandingkan dengan auksin lainnya seperti IAA, 2,4-D menunjukkan aktivitas yang lebih kuat. Aktivitas 2,4-D yang kuat dan optimal ini disebabkan karena gugus karboksil yang dipisahkan oleh karbon atau karbon dan oksigen (Wattimena, 1988).

Menurut penelitian lain, Bustami (2011), melaporkan bahwa induksi kalus dari eksplan daun kacang tanah dengan pemberian zat pengatur tumbuh 2,4-D 2,5 mg/L menunjukkan pembentukan kalus terjadi pada hari ke-6 setelah tanam. Purnomo (2016), membuktikan bahwa induksi kalus eksplan daun sirih hitam dengan pemberian zat pengatur tumbuh 2,4-D 2,0 mg/L mampu menginduksi kalus pada hari ke-9 setelah tanam. Pada penelitian lain yang dilakukan oleh Rohmah

(2014) induksi eksplan daun stevia dengan pemberian zat pengatur tumbuh 2,4-D 2,0 mg/L mampu menginduksi kalus pada hari ke-8 setelah tanam.

Terbentuknya kalus pada seluruh perlakuan 2,4-D (0,5-2,5 mg/L) yang ditambahkan pada media MS termasuk dalam kisaran konsentrasi yang dapat menstimulasi pembentukan kalus. Pada konsentrasi tersebut auksin eksogen (2,4-D yang ditambahkan ke dalam media) dapat berinteraksi dengan auksin endogen (auksin yang terdapat dalam eksplan) untuk merangsang pembelahan sel. Menurut George dan Sherrington (2007), pembentukan kalus sangat dipengaruhi oleh interaksi dan keseimbangan antara zat pengatur tumbuh yang ditambahkan ke dalam media dan zat pengatur tumbuh yang terdapat dalam sel-sel yang dikulturkan.

Penggunaan auksin pada kultur jaringan adalah salah satu usaha untuk menghasilkan kalus pada eksplan. Auksin yang banyak digunakan untuk induksi kalus pada eksplan adalah 2,4-D. Pemberian 2,4-D pada media dasar kultur dapat menginduksi pembentukan kalus dan menyebabkan pertumbuhan kalus terus berlangsung. Hal yang sama juga dihasilkan dari penelitian Collin dan Edward (1998) bahwa konsentrasi auksin sampai 5 ppm dapat menghasilkan pertumbuhan kalus secara optimal.

Perlakuan pada konsentrasi 2,4-D 2,5 mg/L mampu menginduksi kalus dengan cepat yaitu pada minggu kedua. Hal ini disebabkan unsur-unsur hara yang terdapat pada media MS telah mampu menginduksi terbentuknya kalus. Selain itu, dapat disebabkan oleh pemberian konsentrasi 2,4-D 2,5 mg/L mampu merangsang

pembelahan eksplan serta telah mencapai keseimbangan yang tepat sehingga sel-sel terinduksi lebih cepat untuk melakukan pembelahan terus menerus dan melakukan proses dediferensiasi sehingga terbentuk kalus lebih cepat. Akan tetapi waktu induksi kalus yang cepat tidak menjamin pembentukan jumlah kalus yang lebih baik di akhir masa kultur (Mudyantini *et al*, 2004).

Persentase eksplan membentuk kalus pada semua perlakuan yang ditambahkan zat pengatur tumbuh 2,4-D ke dalam media MS terbilang tinggi karena semua perlakuan mampu menginduksi kalus secara sempurna yaitu 100%. Sedangkan perlakuan kontrol yang tanpa diberi zat pengatur tumbuh 2,4-D menunjukkan tidak adanya respon hidup dan tidak membentuk kalus.

Lizawati, dkk (2012) menyatakan konsentrasi zat pengatur tumbuh 2,4-D yang diberikan ke dalam media kultur mampu menginduksi sel-sel yang berpotensi untuk melakukan pembelahan secara terus menerus. Tanpa pemberian zat pengatur tumbuh 2,4-D eksplan tidak memperlihatkan respon hidup yang ditandai dengan tidak adanya bagian sel yang berkembang dan eksplan berubah warna menjadi kehitaman.

Level zat pengatur tumbuh merupakan faktor yang sangat menentukan keberhasilan hidup eksplan berupa pertumbuhan kalus, suspensi sel, dan diferensiasi. Selain itu, keberhasilan eksplan untuk dapat hidup dalam kultur jaringan juga dipengaruhi oleh jenis, umur, dan ukuran eksplan yang digunakan (Collin dan Edward, 1998). Eksplan yang digunakan adalah bagian pucuk dari sirih hitam yang merupakan salah satu bagian meristematik.

Kegagalan eksplan membentuk kalus diduga adanya perbedaan kemampuan jaringan menyerap unsur hara dan zat pengatur tumbuh dalam media induksi kalus. Selain itu eksplan yang tidak membentuk kalus mengalami perubahan warna dari hijau menjadi coklat kemudian mati. Hal ini dapat disebabkan karena timbulnya senyawa fenolik yang keluar dari eksplan tersebut. Menurut Wattimena (1988), bahwa asam-asam fenolik bersama-sama asam absisat (ABA) merupakan inhibitor endogen yang menghambat terbentuknya kalus.

4.2.2 Pengaruh pemberian konsentrasi zat pengatur tumbuh 2,4-D terhadap berat basah dan berat kering kalus daun sirih hitam

Pertumbuhan kalus dapat diketahui melalui berat basah dan berat kering kalus. Berat segar atau berat basah secara fisiologis terdiri dari dua kandungan yaitu air dan karbohidrat. Berat basah kalus yang besar disebabkan karena kandungan airnya yang tinggi (Indah dan Dini, 2013). Berat basah yang dihasilkan sangat tergantung pada kecepatan sel-sel tersebut membelah diri, memperbanyak diri dan dilanjutkan dengan membesarnya kalus.

Berat kering merupakan berat tanaman yang hanya berisi hasil metabolisme setelah kandungan airnya dihilangkan melalui pengeringan. Produksi tanaman lebih akurat dinyatakan dengan berat kering, karena berat kering tidak dipengaruhi oleh kandungan air (Wahyu dkk, 2012).

Biomassa yang dihasilkan pada kultur jaringan sangat bergantung pada kecepatan sel-sel tersebut membelah diri, memperbanyak diri yang dilanjutkan dengan pembesaran sel. Kecepatan sel membelah diri dapat dipengaruhi oleh

adanya zat pengatur tumbuh tertentu dalam konsentrasi yang tertentu tergantung pada tanamannya, juga faktor-faktor dari luar seperti intensitas cahaya dan temperatur (Wattimena dkk., 1992).

Hasil pengukuran berat basah dan berat kering kalus dilakukan setelah delapan minggu masa kultur. Hasil penentuan berat basah dan berat kering kalus eksplan daun sirih hitam menunjukkan hasil yang tidak sama pada setiap perlakuan. Penambahan zat pengatur tumbuh 2,4-D 1,5 mg/L secara optimal dapat menghasilkan rerata berat basah dan berat kering kalus yang paling tinggi dengan berat masing-masing yaitu $0,8951 \pm 0,6408$ gram dan $0,0470 \pm 0,0187$ gram. Berat basah kalus tertinggi pada perlakuan 2,4-D 1,5 mg/L dapat pula menghasilkan berat kering tertinggi. Sementara nilai rerata berat basah paling rendah pada perlakuan 2,4-D 1,0 mg/L dengan berat masing-masing yaitu $0,1307 \pm 0,1021$ gram dan $0,0144 \pm 0,0097$ gram. Kalus yang terbentuk pada perlakuan dipengaruhi adanya auksin, baik endogen maupun eksogen. Auksin dalam kultur jaringan berperan dalam pembentukan kalus.

Menurut penelitian lain, Fadhilah dkk., (2015), melaporkan bahwa perlakuan 2,4-D 1,25 mg/L dan 2,4-D 1,50 mg/L memberikan hasil terbaik untuk berat basah kalus eksplan daun *Artemisia vulgaris* pada media MS yaitu 0,57 gram dan 0,70 gram. Penelitian Rohmah dkk., (2014), melaporkan bahwa perlakuan 2,4-D 1,5 mg/L memberikan hasil berat basah kalus daun stevia sebesar 1,236 gram. Penelitian Purnomo (2016), melaporkan bahwa perlakuan 2,4-D 1,5 mg/L dan BAP 0,0 mg/L hasil berat basah dan berat kering kalus daun sirih hitam sebesar 0,4995 gram dan 0,0503 gram.

Berdasarkan hasil analisis statistik SPSS (tabel 4.2) rerata berat basah kalus perlakuan konsentrasi 2,4-D 1,5 mg/L berbeda nyata dengan perlakuan lainnya, sedangkan rerata berat kering kalus perlakuan konsentrasi 2,4-D 1,5 mg/L tidak berbeda nyata dengan perlakuan konsentrasi 2,5 mg/L dan berbeda nyata dengan perlakuan lainnya.

Perlakuan terbaik untuk peningkatan berat basah kalus terdapat pada konsentrasi 2,4-D 1,5 mg/L, hal ini disebabkan karena aktifitas 2,4-D yang mempengaruhi pertumbuhan eksplan. Wattimena (1988) menyatakan mekanisme kerja auksin salah satunya adalah pemanjangan sel. Auksin mendorong elongasi sel pada koleoptil dan ruas-ruas tanaman. Elongasi sel terutama terjadi pada arah vertikal dan diikuti dengan pembesaran sel dan peningkatan bobot basah.

Kemampuan kalus dalam menyerap dan menyimpan air dipengaruhi oleh tekstur kalus. Sel yang berada pada lapisan luar dan kontak dengan media lebih mudah menyerap air daripada sel yang berada di lapisan dalam. Tekstur kalus yang tidak rata menyebabkan tidak semua sel kalus mampu menyentuh media terutama sel kalus bagian dalam, sehingga kemampuan kalus untuk menyerap dan menyimpan air tidak sama. Hal ini yang diduga menyebabkan perbedaan pola berat basah pada kalus (Abidin, 1990).

4.2.3 Pengaruh pemberian konsentrasi zat pengatur tumbuh 2,4-D terhadap morfologi kalus daun sirih hitam

Morfologi kalus yang diamati pada penelitian ini meliputi warna dan tekstur kalus. Indikator pertumbuhan eksplan pada kultur *in vitro* berupa warna kalus menggambarkan penampilan *visual* kalus sehingga dapat diketahui kalus yang

masih memiliki sel-sel yang aktif membelah atau telah mati. Tekstur kalus merupakan salah satu penanda yang dipergunakan untuk menilai pertumbuhan suatu kalus. Kalus dengan tekstur remah akan berkembang menjadi embrio somatik (Kasi dan Sumaryono, 2008). Sedangkan kalus dengan tekstur kompak merupakan tekstur kalus yang padat dan tidak mudah lepas. Kalus kompak berpotensi tumbuh menjadi organ (*organogenesis*), misalnya terbentuk akar atau tunas (Wahyuni *et al.*, 2014).

Pemberian zat pengatur tumbuh 2,4-D dengan konsentrasi yang berbeda pada eksplan daun sirih hitam menunjukkan morfologi kalus dengan perkembangan yang tidak sama pada beberapa perlakuan. Perkembangan kalus eksplan daun sirih hitam diamati setiap minggu untuk melihat perubahan eksplan secara *visual* dalam membentuk kalus.

Respon eksplan daun sirih hitam terhadap media kultur pada minggu pertama dan kedua yaitu terdapat daun yang melengkung dan bergelombang disebabkan adanya penyerapan nutrisi dalam media kultur. Pada minggu pertama dan kedua juga terlihat perubahan warna sebagian tepi eksplan daun menjadi warna coklat. Hal tersebut dapat terjadi karena keluarnya senyawa fenolik dari eksplan. Menurut Wattimena (1988), bahwa asam-asam fenolik bersama-sama asam absisat (ABA) merupakan inhibitor endogen yang menghambat terbentuknya kalus.

Pencokelatan pada tepi eksplan dapat disebabkan oleh penggunaan bahan tanaman yang tidak meristematik, media kultur yang tidak cocok, proses sterilisasi

eksplan yang berlebihan serta lingkungan yang tidak mendukung pertumbuhan eksplan (Santosa dan Nursandi, 2003).

Berdasarkan hasil penelitian ini, awal munculnya kalus eksplan daun sirih hitam terjadi pada lama waktu yang berbeda-beda, namun masing-masing kalus pada tiap perlakuan memiliki ciri yang sama yaitu warna awal kalus putih. Seiring bertambahnya waktu hingga pengamatan pada minggu kedelapan kalus yang terbentuk memiliki ciri warna putih, putih kekuningan dan putih kecokelatan.

Perbedaan warna hasil induksi kalus diduga karena perbedaan kandungan senyawa kimia dalam kalus sesuai dengan kandungan metabolit sekunder yang berada di dalam masing-masing kalus. Kalus yang berwarna putih merupakan jaringan embrionik yang belum mengandung kloroplas, tetapi memiliki kandungan butir pati yang tinggi. Kalus yang berwarna hijau merupakan kalus yang di dalam sel-selnya mengandung klorofil (Fitriana *et al.*, 2014).

Warna putih hingga kekuningan merupakan salah satu sebagai ciri kalus yang dapat berkembang menjadi embriogenik (Yelnititis, 2012). Kalus berwarna kekuningan, putih kekuningan, serta putih dan bertekstur remah merupakan ciri kalus yang membentuk embrio somatik (Riyadi dan Tirtoboma, 2004). Warna kalus kecokelatan menandakan adanya penuaan sel pada kalus. Sel-sel yang telah tua memiliki daya regenerasi yang rendah (Trimulyono *et al.*, 2004).

Berdasarkan hasil penelitian, eksplan pada perlakuan kontrol atau tanpa pemberian zat pengatur tumbuh 2,4-D pada pengamatan di minggu kelima eksplan berwarna hitam, dimana eksplan yang berwarna hitam menunjukkan eksplan tidak

dapat membentuk kalus dan kemudian eksplan mati, hal ini dapat disebabkan karena timbulnya senyawa fenolik yang keluar dari eksplan tersebut. Menurut Yuswanti *et al.*, (2017) munculnya warna cokelat atau hitam pada eksplan sering kali dapat menghambat pertumbuhan dan perkembangan eksplan bahkan dapat mengakibatkan kematian pada jaringan.

Berdasarkan hasil dari pengamatan pada tabel 4.10 tekstur kalus yang dihasilkan dari semua perlakuan konsentrasi zat pengatur tumbuh 2,4-D yaitu kalus bertekstur remah. Kalus yang bertekstur remah dengan massa sel yang banyak dihasilkan oleh eksplan daun sirih hitam pada perlakuan 2,4-D 1,5 mg/L. Hasil tersebut sejalan dengan penelitian Fadhilah dkk., (2015), melaporkan bahwa pemberian 2,4-D 1,5 mg/L pada eksplan daun *Artemisia vulgaris* menghasilkan kalus berwarna putih kekuningan, hijau kekuningan, dan putih kehijauan, serta kalus yang dihasilkan bertekstur remah. Penelitian Bustami (2011), pemberian 2,4-D 1,5 mg/L pada eksplan daun kacang tanah menghasilkan kalus berwarna putih kekuningan dan kalus bertekstur remah.

Pierik (1987), menyatakan tekstur pada kalus dapat bervariasi dari kompak hingga meremah, tergantung pada jenis tanaman yang digunakan, komposisi nutrisi pada media, zat pengatur tumbuh dan kondisi lingkungan kultur. Menurut Fatmawati (2008), kalus yang sebagian besar bertekstur remah pada eksplan daun *Artemisia annua* disebabkan oleh penggunaan 2,4-D dalam media kultur.

Dari hasil pengamatan menunjukkan semakin tinggi konsentrasi 2,4-D yang diberikan menghasilkan kalus bertekstur remah. Hal ini diduga oleh pemberian

konsentrasi 2,4-D mempengaruhi tekstur kalus, dimana auksin akan merangsang sel-sel untuk terus berkembang, akibatnya semakin tinggi pemberian 2,4-D semakin cepat kemampuan sel untuk membelah membentuk kalus yang remah. Rahayu dkk., (2003) menyatakan peningkatan konsentrasi auksin akan meningkatkan friabilitas kalus. Hal ini sejalan dengan penelitian Yelnitis (2012) yang mendapatkan hasil pertumbuhan kalus dengan pemberian zat pengatur tumbuh 2,4-D akan menghasilkan kalus yang bertekstur kompak sampai bertekstur remah dan subkultur kalus kedalam media tumbuh yang sama mendorong terbentuknya kalus embriogenik.

Pengamatan morfologi yang meliputi tekstur dan warna kalus paling baik dihasilkan oleh eksplan daun sirih hitam pada penambahan zat pengatur tumbuh 2,4-D 1,5 mg/L. Perlakuan tersebut menghasilkan kalus remah dan berwarna putih kekuningan sehingga dapat menghasilkan berat basah dan kering kalus yang paling tinggi.

4.2.4 Ekstraksi kalus sirih hitam dilanjutkan analisis profil metabolit sekunder dengan skrining fitokimia

Uji fitokimia merupakan salah satu langkah penting dalam upaya mengungkap potensi sumber daya tumbuhan obat sebagai antibiotik, antioksidan, dan antikanker (Astuti dkk., 2013).

Ekstraksi kalus sirih hitam pada penelitian ini menggunakan pelarut metanol, karena secara umum pelarut metanol merupakan pelarut yang paling banyak digunakan dalam proses isolasi senyawa organik bahan alam karena dapat melarutkan golongan metabolit sekunder (Prashant *et al.*, 2011). Penelitian

Suryanto dkk., (2009), menunjukkan bahwa metanol mampu mengisolasi lebih banyak jumlah metabolit sekunder untuk senyawa fenolik, flavonoid, dan tanin dalam daun *Artocarpus altilis* F. dibandingkan dengan etanol. Selain itu metanol mempunyai titik didih yang relatif rendah sehingga mudah diuapkan.

Berdasarkan hasil penelitian (Junairiah, *et al.*, 2017), pengujian skrining fitokimia ekstrak metanol daun sirih hitam mengandung kelompok senyawa flavonoid, terpenoid/steroid, dan alkaloid. Pada penelitian ini, skrining fitokimia dilakukan untuk memberi gambaran tentang golongan senyawa yang terkandung dalam ekstrak metanol kalus sirih hitam. Komponen yang terdapat dalam ekstrak metanol kalus sirih hitam. dianalisis golongan senyawanya dengan tes uji warna dengan beberapa pereaksi untuk golongan senyawa flavonoid, terpenoid, steroid, alkaloid, dan saponin.

Uji flavonoid, berdasarkan hasil penelitian pada ekstrak kalus sirih hitam. dengan berbagai konsentrasi 2,4-D, hasil identifikasi flavonoid menggunakan uji Willstater menunjukkan adanya perubahan warna yang berarti positif adanya flavonoid. Hasil pengamatan pada perlakuan konsentrasi 2,4-D 1,5 mg/L terjadi perubahan warna dari kuning kecokelatan menjadi hijau. Sedangkan perlakuan konsentrasi 2,4-D 0,5; 1,0; 2,0; dan 2,5 mg/L negatif adanya flavonoid. Berdasarkan penelitian (Junairiah, *et al.*, 2017) ekstrak metanol daun sirih hitam mengandung flavonoid. Adanya flavonoid ditandai dengan warna merah, orange, dan hijau tergantung pada struktur flavonoid yang terkandung dalam sampel (Kristanti dkk., 2008).

Penambahan logam magnesium dan asam klorida pada uji *Willstater* bereaksi membentuk gelembung-gelembung yang merupakan gas H_2 , dan berfungsi untuk mereduksi inti benzopiron yang terdapat pada struktur flavonoid sehingga terbentuk perubahan warna menjadi merah atau jingga (Prashant *et al.*, 2011). Manfaat flavonoid antara lain untuk melindungi struktur sel, meningkatkan efektivitas vitamin C, antiinflamasi, mencegah keropos tulang dan sebagai antibiotik (Haris, 2011).

Uji terpenoid dan steroid, pengujian terpenoid/steroid didasarkan pada kemampuan senyawa untuk membentuk warna H_2SO_4 pekat dalam pelarut asam asetat anhidrida (Sangi dkk., 2013). Uji positif terpenoid jika menghasilkan warna ungu, merah atau cokelat, sedangkan steroid menghasilkan warna biru atau hijau (Harborne, 2006). Hasil yang diperoleh pada pengujian ekstrak metanol kalus sirih hitam dengan berbagai konsentrasi 2,4-D menunjukkan hasil positif dengan terjadinya perubahan warna dari kuning kecokelatan menjadi merah dan cokelat yang menunjukkan adanya kandungan terpenoid. Hasil pengamatan pada perlakuan konsentrasi 2,4-D 0,5 dan 2,5 terjadi perubahan warna dari kuning kecokelatan menjadi warna merah. Sedangkan perlakuan konsentrasi 2,4-D 1,0; 1,5; dan 2,0 terjadi perubahan warna dari kuning kecokelatan menjadi cokelat. Berdasarkan penelitian (Junairiah, *et al.*, 2017) ekstrak metanol daun sirih hitam mengandung terpenoid/steroid.

Menurut Harborne (2006), senyawa terpen umumnya merupakan senyawa yang larut dalam lemak. Maka berdasarkan tingkat kelarutannya, dalam pengujian golongan senyawa, terpen ditarik dengan eter. Namun dalam penelitian ini

penarikan senyawa terpen dilakukan menggunakan pelarut metanol. Hal ini karena metanol merupakan pelarut yang bersifat universal sehingga dapat melarutkan analit yang bersifat polar dan nonpolar. Terpenoid mempunyai aktivitas sebagai antibakteri, penghambat sel kanker, inhibisi terhadap sintesis kolestrol, antiinflamasi, gangguan menstruasi, gangguan kulit, kerusakan hati, dan malaria (Rumondang, 2013).

Uji alkaloid, pada pengujian alkaloid dilakukan penambahan HCl sebelum ditambahkan pereaksi karena alkaloid bersifat basa sehingga diekstrak dengan pelarut yang mengandung asam (Harborne, 2006). Adanya senyawa alkaloid ditandai dengan terbentuknya endapan putih pada pereaksi Meyer, dan terbentuk endapan cokelat kemerahan pada pereaksi Dragendorf dan Wagner.

Berdasarkan hasil penelitian untuk pengujian alkaloid pada pengujian ekstrak metanol kalus sirih hitam dengan berbagai konsentrasi 2,4-D tidak diperoleh reaksi yang positif atau tidak terbentuk endapan baik untuk uji Meyer, Dragendorf, dan Wagner. Sedangkan berdasarkan penelitian (Junairiah, *et al.*, 2017) ekstrak metanol daun sirih hitam mengandung alkaloid. Hal ini diduga kalus sirih hitam tidak memiliki atau mungkin sedikit memiliki alkaloid, dimana nitrogen tidak digunakan untuk membentuk ikatan kovalen koordinat dengan K^+ yang merupakan ion logam sehingga terbentuk endapan jingga (Sangi dkk., 2013).

Uji saponin, merupakan suatu glikosida alamiah yang terikat dengan steroid dan triterpenoid (Harborne, 2006). Menurut Nurjanah dkk., (2011) suatu sampel dikatakan positif mengandung senyawa saponin bila terbentuk busa yang ditunggu

selama kurang dari 10 menit setinggi 1-10 cm dan busa tidak hilang setelah penambahan asam klorida 2 M. Timbulnya busa disebabkan senyawa saponin memiliki sifat fisik yang mudah terhidrolisa dalam air sehingga senyawa saponin akan menimbulkan busa ketika dikocok. Berdasarkan hasil uji skrining fitokimia senyawa saponin, ekstrak metanol kalus sirih hitam. dengan berbagai konsentrasi 2,4-D tidak terbentuk busa. Berdasarkan penelitian (Junairiah, *et al.*, 2017) ekstrak metanol daun sirih hitam juga tidak mengandung saponin. Hal ini karena tidak semua senyawa pada proses maserasi dapat tersari. Selain itu, tidak terbentuknya busa karena ekstrak kalus sirih hitam tidak dapat larut dalam air sehingga senyawa saponin yang terkandung tidak terhidrolisis dalam air dan tidak menimbulkan busa ketika dikocok (Rustina dan Tasminatun, 2016).

Perbedaan kandungan senyawa kimia antara kalus dan daun yaitu, pada ekstrak metanol kalus sirih hitam terdapat flavonoid dan terpenoid, sedangkan pada ekstrak daun sirih hitam terdapat flavonoid, terpenoid/steroid, dan alkaloid. Perbedaan senyawa kimia antara kalus dan daun sirih hitam dapat terjadi karena pembentukan metabolit sekunder pada kalus dan daun dipengaruhi beberapa faktor diantaranya, metode ekstraksi, ukuran partikel sampel, kondisi dan waktu ekstraksi, serta perbandingan sampel dengan pelarut (Harborne, 2006). Peran zat pengatur tumbuh juga menjadi faktor penting dalam metabolisme tumbuhan.

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian pengaruh 2,4-D terhadap induksi kalus dan profil metabolit sekunder kultur kalus sirih hitam maka dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut :

1. Variasi konsentrasi zat pengatur tumbuh 2,4-D berpengaruh terhadap lama waktu induksi kalus dan persentase eksplan membentuk kalus dari eksplan daun sirih hitam. Pada konsentrasi 2,4-D 2,5 mg/L menunjukkan hasil lama waktu induksi kalus paling cepat yaitu $14,83 \pm 1,9462$ hari setelah tanam. Persentase eksplan membentuk kalus yaitu sebesar 100% pada perlakuan 2,4-D 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; dan 2,5 mg/L, sedangkan eksplan pada perlakuan kontrol atau tanpa pemberian 2,4-D dalam media MS tidak dapat menginduksi terbentuknya kalus.
2. Variasi konsentrasi zat pengatur tumbuh 2,4-D berpengaruh terhadap berat basah dan berat kering kalus eksplan daun sirih hitam. Variasi konsentrasi zat pengatur tumbuh yang optimum untuk berat basah dan berat kering kalus eksplan daun sirih hitam adalah 2,4-D 1,5 mg/L dengan rerata berat masing-masing yaitu $0,8951 \pm 0,6408$ gram dan $0,0470 \pm 0,0187$ gram.
3. Variasi konsentrasi zat pengatur tumbuh 2,4-D berpengaruh terhadap morfologi kalus eksplan daun sirih hitam. Morfologi kalus yang

diamati meliputi warna dan tekstur kalus. Kalus dengan tekstur remah dan berwarna putih kekuningan dihasilkan pada media dengan zat pengatur tumbuh 2,4-D 1,5 mg/L.

4. Hasil pengujian skrining fitokimia terhadap profil metabolit sekunder kalus sirih hitam pada konsentrasi 2,4-D 1,5 mg/L mengandung senyawa flavonoid dan konsentrasi 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 mg/L mengandung senyawa terpenoid.

5.2 Saran

Pada penelitian ini kandungan senyawa dianalisis secara kualitatif menggunakan skrining fitokimia, dimana metode tersebut merupakan metode yang sederhana dengan melihat adanya perubahan warna dari senyawa yang diuji. Pemilihan pelarut untuk ekstraksi merupakan hal yang penting dalam metode skrining fitokimia karena akan berpengaruh terhadap proses kelarutan senyawa yang sedang dilakukan pengujian, sehingga perlu dilakukan analisis kandungan senyawa dengan metode lain seperti kromatografi lapis tipis dan GC-MS (*Gas Chromatography-Mass Spectroscopy*).

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah, M.N., 2011, Daya Hambat Infusum Daun Sirih terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* yang Diisolasi dari Denture Stomatitis, *Penelitian In Vitro*, Medan, Universitas Sumatera Utara.
- Abidin, Z., 1990, *Dasar-dasar Pengetahuan Tentang Zat Pengatur Tumbuh*, Angkasa, Bandung.
- Andaryani, Setianingrum, 2010, Kajian penggunaan berbagai konsentrasi BAP dan 2,4-D terhadap induksi kalus jarak pagar (*Jatropha curcas* L.) secara in vitro, *Skripsi*, Fakultas Pertanian, UNS.
- Armini, A.N.M., Wattimena dan L.W. Gunawan., 1992, *Perbanyakan Tanaman Bioteknologi Tanaman Laboratorium Kultur Jaringan*, Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Pusat Antar Universitas Bioteknologi, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Arief, D.A., Sangi, M.S., Kamu, V.S., 2017, Skrining fitokimia dan uji toksisitas ekstrak biji aren (*Arenga pinnata* MERR.), *Jurnal MIPA UNSRAT*, 6(2):12-15.
- Astuti, J., Rudiyanasyah, dan Gusrizal., 2013, Uji fitokimia dan aktivitas antioksidan tumbuhan paku uban (*Nephrolepis biserrata* (Sw) Schhott), *JKK*, 2(2):118-122.
- Boamponsen, G.A. dan Leung, D.W.M., 2017, Use of compact and friable callus cultures to study adaptive morphological and biochemical responses of potato (*Solanum tuberosum*) to iron supply, *Journal Scientia Horticulturae*, 219, 161-172.
- Budiyanti, R., 2002, Pertumbuhan kalus ibu tangkai daun purwoceng (*Pimpinella alpina* Kds.) dalam media MS dengan pemberian 2,4-D dan BAP, *Skripsi*, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Diponegoro, Semarang.
- Bustami, M.U, 2011, Penggunaan 2,4-D untuk Induksi Kalus Kacang Tanah, *Media Litbang Sulteng Vol. IV*, 2:137-141.
- Campbell, N.A., Reece, J.B., dan Mitchel, L.G., 2003, *Biology* Edisi kelima, Jilid 2, Erlangga, Jakarta.
- Collin, H.A.S., Edward, 1998, *Plant cell culture*, UK: BIOS Scientific Publisher, Pp. 103-1121
- Conquist, A., 1981, *An Integrated System of Classification of Flowering Plant*, New York, Columbia University Press.
- Darmadi, 2008, *Infeksi Nosokomial Problematika dan Pengendaliannya*, Salemba Medika, Jakarta.

- Dodds, J. H., dan L.W. Roberts. 1995, *Experiment in Plants Tissue Culture*, Cambridge University Press, London.
- Fadhilah, N., dkk., 2015, Induksi kalus *Artemisia vulgaris* L. dengan pemberian beberapa konsentrasi *2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid* (2,4-D), *Jurnal Biologi Universitas Andalas*, 4(4): 216-222.
- Fatin, U., 2016, Induksi kalus eksplan daun sirih hitam (*Piper betle* L.) dengan kombinasi konsentrasi zat pengatur tumbuh *Indole Butyric Acid* (IBA) dan kinetin, *Skripsi*, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga.
- Fatmawati, A., 2008, Kajian konsentrasi BAP dan 2,4-D terhadap induksi kalus tanaman *Artemisia annua* L. secara in vitro, *Skripsi*, UNS, Surakarta.
- Fitriana, R.P., E. Ratnasari, dan Isnawati, 2014, Pengaruh Penambahan Berbagai Konsentrasi NAA dan BAP terhadap Induksi Kalus Daun Sirsak (*Annona muricata*) secara In Vitro, *Jurnal Lentera Bio*. ISSN: 2252-3979.
- George, F.P., dan Sherrington, P.D., 2007, *Plant Propagation by Tissue Culture*, Eversley: Hand Book and Directory of Commercial Laboratories Exigetic Limited.
- Gunawan, L.W., 1992, *Teknik Kultur Jaringan*, Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman PAU Bioteknologi IPB, Bogor.
- Hariana, A., 2007, *Tumbuhan Obat dan Khasiatnya*, Edisi Ketiga, Penebar Swadaya, Jakarta.
- Harborne, J.B., 2006, *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*, ITB, Bandung.
- Haris, M., 2011, Penentuan kadar flavonoid total dan aktivitas antioksidan dari daun dewa (*Gynura pseudochina*) dengan spektrofotometer UV-Visibel, *Skripsi*, Fakultas Farmasi, Universitas Andalas, Padang.
- Hendaryono, D.P.S dan Wijayanti, 1994, *Teknik Kultur jaringan dan Petunjuk Perbanyakkan Tanaman Secara Vegetatif Modern*, Kanisius, Yogyakarta.
- Indah, P.N. Dan Dini E., 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*, 2(1).
- Izdihar, F.N., 2016, Pengaruh pemberian *Indole Acetic Acid* (IAA) dan kinetin terhadap induksi kalus dari eksplan daun sirih hitam (*Piper betle* L.) melalui teknik *in vitro*, *Skripsi*, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga.
- Jenie, B.S.L., 2015, Antimicrobial Activity of *Piper betle* L. Extract Towards Foodborne Pathogens and Food Spoilage Microorganisms, *FT Annual Meeting*, New Orleans, Louisiana.

- Junairiah., Ni'matuzahroh, Zuraidassanaaz, N.I., Sulistyorini., 2017, Isolation and Identification of Secondary Metabolites of Black Betel (*Piper betle* L. var. Nigra), *The 2nd Molecular and Cellular Life Sciences.*, Institute of Tropical Disease and Department of Chemistry, FST, Universitas Airlangga.
- Kadiman, K., 2006, *Buku Putih Indonesia 2005-2025 (Penelitian, Pengembangan, dan Penerapan Ilmu Pengetahuan dan Teknologi)*, Kementerian Negara Riset dan Teknologi Republik Indonesia, Jakarta.
- Karuppusamy, S., 2009, A Review on Trends in Production of Secondary Metabolites from Higher Plants by in vitro Tissue, Organ and Cell Culture, *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(13): 1222-1239.
- Kasi, P.D., dan Sumaryono, 2008, Perkembangan kalus embriogenik sagu (*Metroxylon sagu* Rottb.) pada tiga sistem kultur in vitro, *Menara Perkebunan Vol. 76, No. 1* : 1-10.
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2011, *Profil Kesehatan Indonesia 2010*, Jakarta, Kementerian Kesehatan Republik Indonesia.
- Kinho, J., Arini, D., Halawane, J., Nuraini, L., Halidah, 2011, *Tumbuhan Obat Tradisional Di Sulawesi Utara*, Jilid II, Ristek, Manado.
- Kristanti, A.N., Aminah, N.S., Mulyadi, T., Kurniadi, B., 2008, *Buku Ajar Fitokimia*, Airlangga University Press, Surabaya.
- Kumala, S. dan Siswanto, E.B., 2007, Isolation and screening of endophytic from *Morinda citrifolia* and their ability to produce anti-microbial substance, *Microbiol Indones*, 1(3); 145-148.
- Lizawati, 2012, Induksi kalus eksplan daun durian (*Durio zibethinus* Murr. cv. selat Jambi) pada beberapa kombinasi 2,4-D dan BAP, *Jurnal program Studi Agroekoteknologi, Fakultas Pertanian Universitas Jambi Vol. 1*, No. 1: 23-29.
- List, P.H. dan Schmidt, P.C., 1989, *Phytopharmaceutical Technology*, CRC Press Inc, Boston.
- Mandal, V., 2007, Microwave Assisted Extraction An Innovation and Promising Extraction Tool For Medical Plant Research, *Pharmacognosy Reviews*, Vol. 1, Issue 1.
- Manuhara, Y.S.W., 2014, *Kapita Selektta Kultur Jaringan Tumbuhan*, Airlangga University Press, Surabaya.
- Meagher, M.G., dan J. Green, 2002, Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of saw palmetto, an important landscape and medical plant, *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 66:253-256.
- Moeljanto, R.D., dan Mulyono, 2004, *Khasiat dan Manfaat Daun Sirih Obat Mujarab dari masa ke masa* Edisi I, Agromedia Pustaka, Jakarta.

- Moko, H, E.M. Rahmat, S.M.D. Rosita, 1993, Respon meniran terhadap penggunaan zat pengatur tumbuh, *Warta Tumbuhan Obat Indonesia*, 2(4): 1-3.
- Mudyantini, W., Sobchan, dan Handyanto, A., 2004, Pengaruh variasi konsentrasi asam naftalen asetat terhadap pertumbuhan dan kandungan flavonoid kalus daun dewa, *Biofarmasi*, 2(2): 69.
- Nugroho, A., Sugito, H., 2005, *Pedoman Pelaksanaan Teknik Kultur Jaringan*, Penebar Swadaya, Depok.
- Nurjanah, Laili, I., Abdullah, A., 2011, Aktivitas antioksidan dan komponen bioaktif kerang pisau (*Solen sp.*), *Ilmu Kelautan*, Departemen Teknologi Hasil Perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan IPB, Vol.16:119-124.
- Parmana, D., 2015, Pengaruh konsentrasi hormon 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid) terhadap induksi kalus daun tembakau (*Nicotiana tabacum L.*) melalui kultur *in vitro*, *Skripsi*, Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan, Universitas Jember.
- Perry dan Potter, 2005, *Buku Ajar Fundamental Keperawatan*, Edisi 4, EGC, Jakarta.
- Pierik, R.I.M., 1987, *In Vitro Culture of Higher Plants*, Martinus Nijhoff Publishers Dordrecht, Netherlands.
- Prashant, *et al.*, 2011, Phytochemical Screening and Extraction, *Internationale Pharmaceutica Scientia*, 1(1):1-9.
- Pratiwi, I., 2009, *Uji Antibakteri Ekstrak Kasar Daun Acalypha indica terhadap Bakteri Salmonella choleraesuis dan Salmonella typhimurium*, Biologi FMIPA UNS, Surakarta.
- Purnomo, 2016, Induksi kalus dari eksplan daun sirih hitam (*Piper betle L.*) dengan pemberian variasi zat pengatur tumbuh 2,4-Dichlorophenoxy Acetic Acid dan Benzyl Adenine, *Skripsi*, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga.
- Rachmah, A., 2016, Induksi kalus eksplan daun sirih hitam (*Piper betle L.*) dengan pemberian kombinasi zat pengatur tumbuh Indole Butyric Acid (IBA) dan 6-Benzyl Amino Purine (BAP), *Skripsi*, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga.
- Rahayu, B., Solichatun dan Anggarwulan, E., 2003, Pengaruh Asam 2,4-Diklorofenoksiasetat (2,4-D) terhadap Pembentukan dan Pertumbuhan Kalus serta Kandungan Flavonoid Kultur Kalus *Acalypha indica L.*, *Jurnal Biofarmasi*, 1(1), 1-6.
- Rahayu, 2013, *rare actinomycetes* dari material vulkanik merapi sebagai sumber antibiotik baru: isolasi dan karakterisasi, LP2M, UMS, Surakarta.

- Rija'i, A.J., 2015, Telaah fitokimia kandungan metabolit sekunder dalam ekstrak daun sirih hitam (*Piper betle* L.) dan uji bioaktivitasnya terhadap larva udang (*Artemia salina* Leach.), *Skripsi*, Universitas Islam Bandung, Bandung.
- Rinanto, Y., 2011, Induksi kalus dan deteksi kandungan alkaloid daun jarak pagar (*Jatropha curcas* L.) menggunakan 2,4-D dalam media MS, *Jurnal Agrovigor*, 4(1), 1-6.
- Riyadi, I dan Tirtoboma, 2004, Pengaruh 2,4-D terhadap induksi embrio somatik kopi arabica, *Buletin Plasma Nutfah* 10 (2) : 82-89.
- Rohmah, S.N., 2007, Penggunaan BAP dan 2,4-D dalam Kultur In Vitro Iles-iles (*Amorphophallus muelleri* Blume). *Tugas Akhir*, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Rohmah, D.I, Ratnasari, E., Isnawati., 2014, Pengaruh berbagai konsentrasi Dichlorophenoxy Acetic Acid terhadap kecepatan induksi dan viabilitas kalus daun Stevia (*Stevia rebaudiana*) pada medium *New Phalaenopsis* secara in vitro, *Jurnal Lentera Bio*, 3(1) : 33-37.
- Rustina., dan Tasminatun, S., 2016, Uji aktivitas antioksidan dan antibakteri ekstrak etil asetat biji labu kuning (*Cucurbita moschata* Duch. Poir), Farmasi FKIK, UMY.
- Rumondang, M., Kusriani, D., dan Fachriyah, E., 2013, Isolasi, identifikasi, dan uji antibakteri senyawa triterpenoid dari ekstrak n-heksana daun tempuyung (*Sochus arvensis* L.) *Chem Info*:156-164.
- Sangi, M.S., Momuat, LI., dan Kumaunang, M., 2013, Uji toksisitas dan skrining fitokimia tepung gabah pelepah aren (*Arange pinnata*), Manado: Universitas Sam Ratulangi.
- Santosa, U. dan Nursandi, F., 2003, *Kultur Jaringan Tanaman*, Universitas Muhammadiyah Malang Press, Malang.
- Schrimer, 2012, Completing a Pathway to Plant Vitamin Synthesis, *The National Academy of Science of the USA*, PNAS Journal, 104, 9190-9110.
- Steenis, C.G.G.J van., 2005, *Flora* Cetakan kedelapan. PT. Pradnya Paramita, Jakarta, 163-164.
- Sugiyono, 2006, *Metode Penelitian Administrasi*, Alfa beta, Bandung.
- Suryanto, E., dan F. Wehantouw, 2009, Aktivitas penangkap radikal bebas dari ekstrak fenolik daun sukun (*Artocarpus alitis* F.), *Chem, Prog*, 2(1).
- Suryanto dan Setiawan, 2013, Struktur Data *Datawarehouse* Tanaman Obat Indonesia dan Hasil Penelitian Obat Tradisional, Seminar Nasional Sistem Informasi Indonesia.

- Sutini, Tatik, W., Wahyu, W., S.B Sumitro, 2008, Meningkatkan Produksi *flavan-3-ol* melalui Kalus *Camellia Sinensis* L. dengan elisator CU^{2+} , *Jurnal Berk, Penel, Hayati*, 14, 39-44.
- Syahid, S.F. dan Natalini, N.K., 2007, Induksi dan Regenerasi Kalus Keladi Tikus (*Typonium flagelliforme* Lodd.) secara In Vitro, *Jurnal Littri*, 13(4), 142-146.
- Taiz, L., E. Zeiger, 2006, *Plantphysiology*, Sinaur Associates, Inc, Publishers Sunderland, Massachusetts.
- Trimulyono, G., Solichatun, dan S.D. Marlina, 2004, Pertumbuhan Kalus dan Kandungan Minyak Atsiri Nilam (*Pogostemon cablin* (Blanco) Bth.) dengan perlakuan Asam α -Naftalen Asetat (NAA) dan Kinetin. *Biofarmasi Vol. 2, No. 1*: 9-14.
- Tunger, O., Karakaya, Y., Cetin, C.B., 2009, Rational Antibiotic Use, *J Infect Developing Countries*, 3(2); 88-93.
- Wahyu, H., Yulita, N., Nintya., S., 2012, Respon pertumbuhan dan produksi alkaloid pada kalus berakar *Datura metel* L. terhadap peningkatan mikronutrien dari medium MS, *Buletin Anatomi dan Fisiologi*, Vol XX, No.1 : 29-36.
- Wahyuni, D.K., D. Prasetyo, dan S. Hariyanto, 2014, Perkembangan kultur daun *Aglaonema* sp. dengan perlakuan kombinasi zat pengatur tumbuh NAA dan 2,4-D dengan BAP, *Jurnal Bioslogos Vol. 4, No. 1* : 9-16.
- Wardani, Dian Pramita, Solichatun, dan Ahmad Dwi Setyawan, 2004, Pertumbuhan dan Produksi Saponin Kultur Kalus *Talinum paniculatum* Gaertn. pada Variasi Penambahan Asam diklorofenoksi Asetat (2,4-D) dan Kinetin. *Jurnal Biofarmasi* 2(1), 35-43.
- Wattimena, G.A., 1988, *Zat pengatur tumbuh*, Pusat Antara Universitas, Institut Pertanian Bogor.
- Wattimena, G.A.L., Gunawan, Mattjik, Samsudin, N.A. Wiendi, dan Ernawati., 1992, *Bioteknologi tanaman*, Pusat Antar Universitas Bioteknologi.
- Widyawati, Geningsih, 2010, Pengaruh variasi konsentrasi NAA dan BAP terhadap induksi kalus jarak pagar (*Jatropha curcas* L.), *Tesis*, Biosains, UNS, Surakarta.
- Yanti, 2012, *Piper betle* var. Nigra. www.thebest-healthy-foods.com. Diakses pada tanggal 02 Oktober 2017 pukul 09.55 WIB.
- Yelnititis, 2012, Pembentukan kalus remah dari eksplan daun Ramin (*Gonystylus bancanus* (Miq) Kurz). *Jurnal Pemuliaan Tanaman Hutan*, 6: 181-194.
- Yusnita, 2003, *Kultur Jaringan: Cara memperbanyak Tanaman Secara Efisien*, Agro Media Pustaka, Jakarta.

Yuswanti, H., Purba, R.V., Astawa, I.N.G., 2017, Induksi Kalus Eksplan Daun Tanaman Anggur (*Vitis vinivera* L.) dengan Aplikasi 2,4-D secara In Vitro, *E-Jurnal Agroekoteknologi Tropika*, 6(2): 218-228.

Zulkarnain, 2009, *Kultur Jaringan Tanaman*, Bumi Aksara, Jakarta.

Zuraidassanaaz, N.I., 2016, Induksi kalus eksplan daun sirih hitam (*Piper betle* L.) dengan kombinasi konsentrasi zat pengatur tumbuh *Indole-3-Acetic Acid* (IAA) dan *Benzyl Amino Purin* (BAP), *Skripsi*, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Komposisi Media *Murashige and Skoog* (MS) padat (Manuhara *et al.*, 2014)

Bahan makronutrien	Untuk 1 liter media (mg)	
NH ₄ NO ₃	1.650	
KNO ₃	1.900	
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	
KH ₂ PO ₄	170	
Stok mikronutrien	Konsentrasi 100x (mg/100 ml)	Keterangan
MnSO ₄ .H ₂ O	2,230	Untuk 1 liter media MS diperlukan 1 ml larutan stok mikronutrien
ZnSO ₄ .4H ₂ O	860	
H ₃ BO ₃	620	
KI	83	
NaMoO ₄ .2H ₂ O	25	
CuSO ₄ .5H ₂ O	2,5	
CoCl ₂ .6H ₂ O	2,5	
Stok zat besi	Konsentrasi 40x (mg/200 ml)	Keterangan
Na ₂ EDTA	1.492	Untuk 1 liter media MS diperlukan 5 ml larutan stok zat besi
Fe ₂ SO ₄ .7H ₂ O	1.112	
Stok vitamin	Konsentrasi 50x (mg/200 ml)	Keterangan
<i>Glycine</i>	100	Untuk 1 liter media MS diperlukan 4 ml larutan stok vitamin
<i>Nicotinic acid</i>	25	
<i>Pyridoxine-HCl</i>	25	
<i>Thiamine-HCl</i>	5	
Bahan Organik	Untuk 1 liter media (g)	
Myo-inositol	0,1	
Sukrosa	30	
Agar	8	

Lampiran 2. Data Lama Waktu Induksi Kalus Sirih Hitam

Ulangan	Perlakuan Konsentrasi Zat Pengatur Tumbuh (mg/L)					
	2,4-D 0,0	2,4-D 0,5	2,4-D 1,0	2,4-D 1,5	2,4-D 2,0	2,4-D 2,5
1	0	19	20	18	21	14
2	0	19	20	18	21	14
3	0	19	20	18	18	14
4	0	18	21	18	18	14
5	0	18	22	18	18	13
6	0	20	22	14	14	13
7	0	20	20	14	19	14
8	0	20	20	14	19	18
9	0	18	20	18	19	18
10	0	18	21	18	21	18
11	0	18	21	14	21	14
12	0	19	21	14	21	14
Rata-rata	0	18,8333	20,6667	16,3333	19,1667	14,8333
SD	0	0,8348	0,7784	2,0597	2,0816	1,9462

Lampiran 3. Hasil Uji Normalitas dan Homogenitas Lama Waktu Induksi Kalus Sirih Hitam

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Waktu Induksi Kalus
N		72
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	14,97
	Std. Deviation	7,162
Most Extreme Differences	Absolute	,289
	Positive	,172
	Negative	-,289
Test Statistic		,289
Asymp. Sig. (2-tailed)		,000 ^c

- a. Test distribution is Normal.
- b. Calculated from data.
- c. Lilliefors Significance Correction.

Test of Homogeneity of Variances

Waktu Induksi Kalus

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
11,903	5	66	,000

ANOVA

Waktu Induksi Kalus

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3491,611	5	698,322	306,580	,000
Within Groups	150,333	66	2,278		
Total	3641,944	71			

Lampiran 4. Data Berat Basah dan Berat Kering Kalus Sirih Hitam

Konsentrasi 2,4-D (ppm)	Replikasi	Berat Basah (gram)	Berat Kering (gram)
2,4-D 0	1	0	0
	2	0	0
	3	0	0
	4	0	0
	5	0	0
	6	0	0
	7	0	0
	8	0	0
	9	0	0
	10	0	0
	11	0	0
	12	0	0
	Rata-rata	0	0
	SD	0	0

Konsentrasi 2,4-D (ppm)	Replikasi	Berat Basah (gram)	Berat Kering (gram)
2,4-D 0,5	1	0,1302	0,0202
	2	0,0916	0,0164
	3	0,0824	0,0155
	4	0,1429	0,0170
	5	1,1857	0,0354
	6	0,8948	0,0350
	7	0,9925	0,0349
	8	0,7867	0,0245
	9	0,0606	0,0092
	10	0,3124	0,0288
	11	0,0987	0,0125
	12	0,0770	0,0100
	Rata-rata	0,404625	0,021616667
	SD	0,4280333	0,009842564

Konsentrasi 2,4-D (ppm)	Replikasi	Berat Basah (gram)	Berat Kering (gram)
2,4-D 1	1	0,0672	0,0105
	2	0,0350	0,0062
	3	0,0536	0,0083
	4	0,1164	0,0118
	5	0,1272	0,0161
	6	0,1445	0,0176
	7	0,4145	0,0352
	8	0,1165	0,0120
	9	0,2087	0,0323
	10	0,0446	0,0052
	11	0,1006	0,0078
	12	0,1407	0,0102
	Rata-rata	0,130791667	0,014433333
	SD	0,102153863	0,009743001

Konsentrasi 2,4-D (ppm)	Replikasi	Berat Basah (gram)	Berat Kering (gram)
2,4-D 1,5	1	1,3148	0,0445
	2	1,4457	0,0524
	3	0,8428	0,0487
	4	1,9829	0,0757
	5	1,9725	0,0873
	6	0,6736	0,0417
	7	0,8330	0,0518
	8	0,5501	0,0465
	9	0,2051	0,0258
	10	0,3054	0,0328
	11	0,2530	0,0255
	12	0,3634	0,0323
	Rata-rata	0,895191667	0,047083333
	SD	0,640804203	0,018749053

Konsentrasi 2,4-D (ppm)	Replikasi	Berat Basah (gram)	Berat Kering (gram)
2,4-D 2	1	0,2580	0,0275
	2	0,0984	0,0146
	3	0,3676	0,0324
	4	0,5732	0,0463
	5	0,1733	0,0211
	6	0,2838	0,0172
	7	0,1336	0,0166
	8	0,2536	0,0324
	9	0,2657	0,0243
	10	0,1935	0,0244
	11	0,2030	0,0242
	12	0,2971	0,0197
	Rata-rata	0,2584	0,025058333
	SD	0,123928586	0,008809959

Konsentrasi 2,4-D (ppm)	Replikasi	Berat Basah (gram)	Berat Kering (gram)
2,4-D 2,5	1	0,2285	0,0209
	2	0,2318	0,0289
	3	0,1292	0,0166
	4	0,0653	0,0108
	5	0,1260	0,0133
	6	0,0887	0,0131
	7	0,2498	0,0281
	8	0,2091	0,0235
	9	0,0865	0,0100
	10	0,1919	0,0149
	11	0,3519	0,0175
	12	0,2205	0,0142
	Rata-rata	0,1816	0,01765
	SD	0,084091811	0,00636903

Lampiran 5. Hasil Uji Normalitas dan Homogenitas Berat Basah dan Berat Kering Kalus Sirih Hitam

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Berat Basah	Berat Kering
N		72	72
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	,311768	,020974
	Std. Deviation	,4259004	,0174368
Most Extreme Differences	Absolute	,263	,118
	Positive	,263	,118
	Negative	-,232	-,115
Test Statistic		,263	,118
Asymp. Sig. (2-tailed)		,000 ^c	,014 ^c

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. Lilliefors Significance Correction.

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Berat Basah	20,062	5	66	,000
Berat Kering	5,359	5	66	,000

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Berat Basah	Between Groups	5,985	5	1,197	11,460	,000
	Within Groups	6,894	66	,104		
	Total	12,879	71			
Berat Kering	Between Groups	,014	5	,003	25,959	,000
	Within Groups	,007	66	,000		
	Total	,022	71			

Lampiran 6. Hasil Uji Kruskal-Wallis Lama Waktu Induksi Kalus Sirih Hitam

Kruskal-Wallis Test

Ranks			
	Perlakuan	N	Mean Rank
Waktu Induksi Kalus	2,4-D 0,0	12	6,50
	2,4-D 0,5	12	45,79
	2,4-D 1,0	12	62,42
	2,4-D 1,5	12	30,04
	2,4-D 2,0	12	50,63
	2,4-D 2,5	12	23,63
	Total		72

Test Statistics ^{a,b}	
	Waktu Induksi Kalus
Chi-Square	58,375
df	5
Asymp. Sig.	,000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Perlakuan

Lampiran 7. Hasil Uji Kruskal-Wallis Berat Basah Kalus Sirih Hitam

Kruskal-Wallis Test

Ranks			
	Perlakuan	N	Mean Rank
Berat Basah	2,4-D 0,0	12	6,50
	2,4-D 0,5	12	40,75
	2,4-D 1,0	12	28,50
	2,4-D 1,5	12	61,08
	2,4-D 2,0	12	45,58
	2,4-D 2,5	12	36,58
	Total		72

Test Statistics ^{a,b}	
	Berat Basah
Chi-Square	45,935
df	5
Asymp. Sig.	,000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Perlakuan

Lampiran 8. Hasil Uji Kruskal-Wallis Berat Kering Kalus Sirih Hitam

Kruskal-Wallis Test

Ranks			
	Perlakuan	N	Mean Rank
Berat Kering	2,4-D 0,0	12	6,50
	2,4-D 0,5	12	40,54
	2,4-D 1,0	12	27,88
	2,4-D 1,5	12	63,29
	2,4-D 2,0	12	46,13
	2,4-D 2,5	12	34,67
	Total		72

Test Statistics ^{a,b}	
	Berat Kering
Chi-Square	49,671
df	5
Asymp. Sig.	,000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Perlakuan

Lampiran 9. Tabel Tabulasi Hasil Uji Mann-Whitney Lama Waktu Induksi Kalus Sirih Hitam

	2	3	4	5	6
1	S	S	S	S	S
2		S	S	TS	S
3			S	S	S
4				S	TS
5					S
6					

Keterangan : Signifikan (S), Tidak Signifikan (TS)

1. 2,4-D 0,0 mg/L
2. 2,4-D 0,5 mg/L
3. 2,4-D 1,0 mg/L
4. 2,4-D 1,5 mg/L
5. 2,4-D 2,0 mg/L
6. 2,4-D 2,5 mg/L

Lampiran 10. Tabel Tabulasi Hasil Uji Mann-Whitney Berat Basah dan Berat Kering Kalus Sirih Hitam

Berat Basah

	2	3	4	5	6
1	S	S	S	S	S
2		TS	S	TS	TS
3			S	S	TS
4				S	S
5					TS
6					

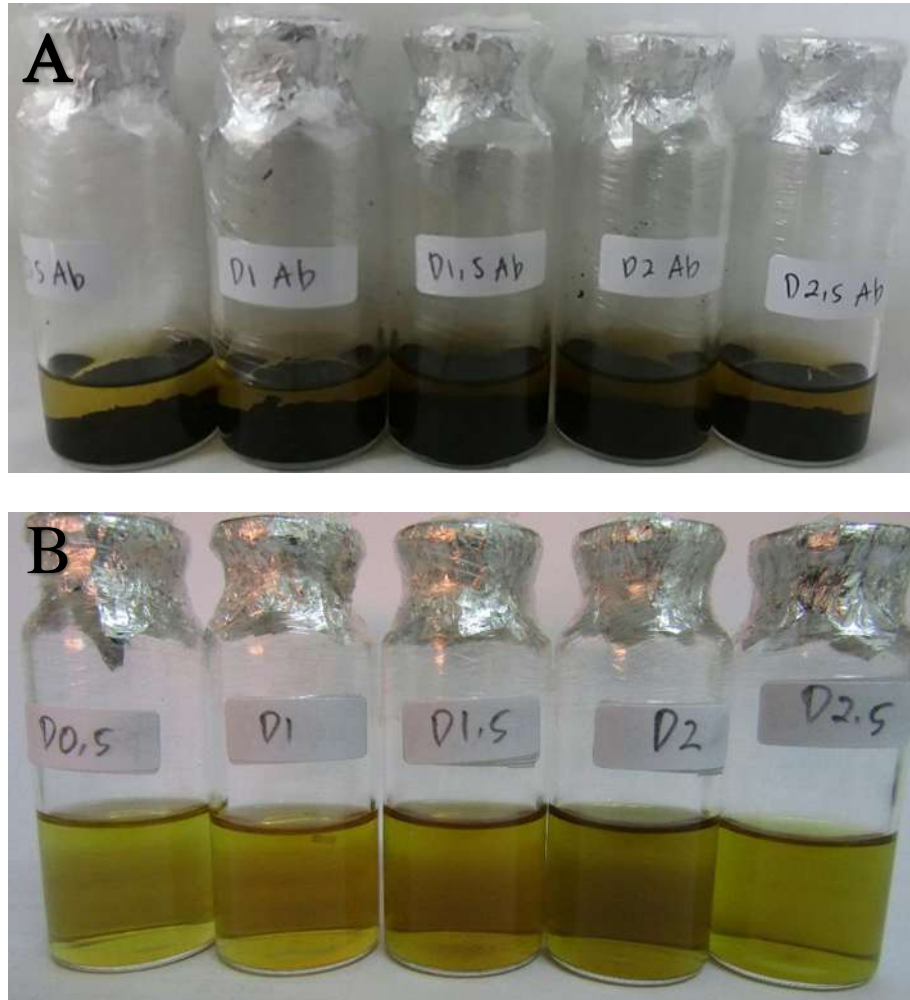
Berat Kering

	2	3	4	5	6
1	S	S	S	S	S
2		S	S	TS	TS
3			S	S	TS
4				S	S
5					S
6					

Keterangan : Signifikan (S), Tidak Signifikan (TS)

1. 2,4-D 0,0 mg/L
2. 2,4-D 0,5 mg/L
3. 2,4-D 1,0 mg/L
4. 2,4-D 1,5 mg/L
5. 2,4-D 2,0 mg/L
6. 2,4-D 2,5 mg/L

Lampiran 11. Ekstraksi Kalus Sirih Hitam dari Berbagai Konsentrasi Zat Pengatur Tumbuh 2,4-D



Keterangan: **A.** Perendaman bubuk kalus dengan pelarut metanol; **B.** Hasil penyaringan ekstrak kalus