

ANALISIS PERTUMBUHAN DAN KANDUNGAN TOTAL FLAVONOID KULTUR KALUS KRISAN (*Chrysanthemum morifolium* Ramat) DENGAN PEMBERIAN ASAM 2,4-DIKLOROFENOKSIASETAT (2,4-D) DAN AIR KELAPA

Tia Setiawati^{1*}, Anggita Levi Astuti², Mohamad Nurzaman³, Nining Ratningsih⁴

^{1,2,3,4} Departemen Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Padjadjaran

*Corresponding author: tia@unpad.ac.id

Abstract

Chrysanthemum morifolium contains flavonoids which have antioxidant properties and was useful in treating various diseases. The production of flavonoids from plants can be done in vitro through callus culture. Auxin 2,4-D growth regulators and organic compounds such as coconut water added to the media can affect the success of callus formation and secondary metabolite synthesis. The purpose of this study was to obtain the best treatment of 2,4-D concentration and coconut water that can increase the growth and total flavonoid levels of *C. morifolium* callus cultures. The method used in this research was the experimental method completely randomized design (CRD) with 8 treatments, namely 1 ppm 2,4-D + 10% coconut water (CW); 2 ppm 2,4-D + 10% CW; 3 ppm 2,4-D + 10% CW ; 4 ppm 2,4-D + 10% CW; 1 ppm 2,4-D; 2 ppm 2,4-D; 3 ppm 2,4-D; 4 ppm 2,4-D in 4 replication. The results showed that the treatment of 4 ppm 2,4-D and 10% CW was the best treatment combination, resulting in an average callus size (1.4 cm), fresh weight (0.19 grams), dry weight (0.16 gram) and total flavonoid content (1.873 mgQE/g).

Keywords: *Zanthoxylum acanthopodium*, essential oil, anti-microbial.

PENDAHULUAN

Chrysanthemum morfolium atau yang biasa dikenal dengan krisan merupakan tanaman hias yang banyak dibudidayakan masyarakat karena bernilai ekonomi tinggi (Mufarrikha *et al.*, 2014). Tanaman krisan digunakan pula sebagai obat herbal atau obat tradisional yang terkenal di Tiongkok dan Thailand karena mengandung beberapa senyawa aktif salah satunya flavonoid (Jung, 2009; Kalia *et al.*, 2016). Krisan mengandung 12 jenis flavonoid dan 58 senyawa volatil seperti quercetin-3-galactoside, luteolin-7-glucoside, quercetin-3-glucoside, quercitrin, quercetin, myricetin, luteolin, apigenin dan kaempferol (Sun *et al.*, 2010).

Flavonoid merupakan salah satu senyawa antioksidan alami yang berasal dari suatu tanaman dan menjadi salah satu pusat perhatian penelitian karena peranannya yang bersifat obat dalam pencegahan kanker dan penyakit kardiovaskular, anti inflamasi, antihistamin, meningkatkan efektivitas vitamin C, dan mencegah keropos tulang (Bharati *et al.*, 2014; Prakash *et al.*, 2014). Zhong (2001) menjelaskan bahwa secara umum masalah dalam produksi senyawa aktif metabolit sekunder dari suatu tanaman adalah dibutuhkannya upaya alternatif yang efektif.

Metode alternatif dalam produksi senyawa aktif flavonoid dari suatu tanaman dapat dilakukan secara *in vitro* melalui

kultur kalus. Kelebihan kultur kalus dalam produksi metabolit sekunder dibandingkan dengan tanaman utuh adalah tidak memerlukan lahan yang luas, tidak adanya keterbatasan iklim serta senyawa aktif yang diperoleh bersifat kontinyu dalam keadaan terkontrol (Razavi *et al.*, 2016).

Beberapa penelitian telah membuktikan bahwa kultur kalus dapat meningkatkan produksi metabolit sekunder seperti saponin pada tanaman ginseng jawa (*Talinum paniculatum*) (Wardani *et al.*, 2004), tannin pada tanaman jati belanda (*Guazuma ulmifolia*) (Syahid dan Hernani, 2010), alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, steroid dan etil para-metoksisinamat pada tanaman kencur (*Kaemferia galanga*) (Shofiyani & Damayanti, 2017)

Lestari (2011) menyatakan bahwa induksi kalus sangat dipengaruhi oleh zat pengatur tumbuh (ZPT) auksin. Auksin 2,4-D dapat merangsang pembentukan kalus karena aktivitasnya yang kuat untuk memacu proses diferensiasi sel, organogenesis dan menjaga pertumbuhan kalus (Rivai & Helmanto, 2015). Dalam induksi kalus, selain ZPT auksin sering diperlukan penambahan sitokinin (Syahid & Hernani, 2010). Seiring dengan kemajuan pengetahuan dan teknologi tentang biokimia, saat ini telah ditemukan beberapa senyawa yang memiliki fungsi fisiologis serupa dengan hormon tumbuhan (Yong *et al.*, 2009), termasuk sitokinin.

Sumber sitokinin alami yang banyak digunakan dalam kultur jaringan adalah air kelapa. Penggunaan air kelapa sebagai bahan organik merupakan salah satu cara yang efektif untuk menggantikan penggunaan ZPT sintesis (Tuhuteru *et al.*, 2012). Selain itu, air kelapa memiliki kandungan unsur hara makro seperti nitrogen (N), kalium (K), magnesium (Mg), sulfur (S) dan unsur mikro seperti (Fe), mangan (Mn), seng (Zn), tembaga (Cu) hingga sumber karbon seperti sukrosa, glukosa dan fruktosa untuk mendukung pertumbuhan kalus (Kristina & Syahid, 2012). Penambahan ZPT 2,4-D yang dikombinasikan dengan air kelapa terbukti dapat meningkatkan pertumbuhan kalus seperti pada tanaman anggur hijau (*Vitis vinifera* L.) (Dwi *et al.*, 2012), brotowali (*Tinospora crispa* L.) (Sukmawati *et al.*, 2018).

Secara umum pertumbuhan kalus yang baik akan menghasilkan kadar metabolit sekunder yang tinggi pula (Syahid & Hernani, 2010). Isah *et al.* (2018) bahwa ketika pertumbuhan dan produktivitas pada suatu tanaman meningkat, maka akan meningkatkan pula produksi metabolit sekundernya. Dengan demikian dalam penelitian ini, penambahan 2,4-D dan air kelapa dalam media induksi kalus krisan diharapkan dapat meningkatkan pertumbuhan kalus yang diikuti dengan peningkatan kadar

flavonoidnya. Penelitian diharapkan dapat memberikan informasi mengenai aplikasi kultur kalus dengan penambahan 2,4-D dan air kelapa sebagai upaya alternatif dalam meningkatkan produksi metabolit sekunder khususnya kadar flavonoid total secara efektif.

METODE PENELITIAN

Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah air kelapa muda, akuades, AlCl_3 10%, alkohol 70%, bubuk agar (pemadat media), CH_3COOK 1 M, daun planlet *C. morifolium* Ramat. Var. Pasopati yang diperoleh dari Balai Pengembangan Benih dan Hortikultura dan Aneka Tanaman Pasir Banteng Sumedang, deterjen cair, etanol 80%, etanol 95%, HCl 1 N, media *Murashige & Skoog* (MS), NaOH 1 N, standar kuersetin, sukrosa (gula), dan ZPT 2,4-Diklorofenoksiasetat [Sigma].

Rancangan Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimental Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 8 perlakuan yaitu 1 ppm 2,4-D + 10% air kelapa (AK); 2 ppm 2,4-D + 10% AK; 3 ppm 2,4-D + 10% AK; 4 ppm 2,4-D + 10% AK; 1 ppm 2,4-D; 2 ppm 2,4-D; 3 ppm 2,4-D; 4 ppm 2,4-D. Setiap perlakuan dilakukan sebanyak 4 kali pengulangan. Parameter yang diamati adalah waktu

munculnya kalus, warna dan tekstur kalus, ukuran kalus, berat basah dan berat kering kalus, dan kadar flavonoid total. Data warna, tekstur, dan waktu muncul kalus dianalisis secara deskriptif sedangkan data ukuran kalus, berat basah kalus, berat kering kalus dan kadar flavonoid total dianalisis secara statistik menggunakan Analisis Varians (ANOVA) untuk mengetahui pengaruh perlakuan dan jika berbeda nyata dilanjutkan dengan Uji Jarak Berganda Duncan untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan.

Prosedur Penelitian

Sterilisasi ruang tanam dan alat-alat kultur

Alat-alat kultur kaca disterilisasi basah menggunakan *autoclave* pada tekanan 1 atm dengan suhu 121°C selama 15 menit. Alat-alat diseksi seperti pinset, *scalpel*, pisau dan gunting disterilisasi kering menggunakan oven pada suhu 150°C selama 60 menit. *Laminar Air Flow Cabinet* (L AFC) disterilkan terlebih dahulu sebelum digunakan dengan disemprot alkohol 70% dan diratakan menggunakan kapas ke seluruh permukaan yang selanjutnya disinari ultraviolet (UV) selama satu jam (Tuhuteru *et al.*, 2012).

Pembuatan media perlakuan dan penanaman eksplan

Media perlakuan dibuat dengan menimbang bahan-bahan yang akan digunakan, seperti media MS, sukrosa (gula), agar (pemadat media) berturut-turut

sebanyak 4,43 gram, 25 gram dan 9 gram untuk satu liter media. Penambahan 2,4-D dan air kelapa sesuai konsentrasi yang telah ditentukan sebagai perlakuan. Media dihomogenkan dan keasaman media diatur pada pH 5,6 – 5,8 lalu dipanaskan. Media perlakuan dituangkan ke dalam botol-botol kultur dan ditutup dengan *alumunium foil*, kemudian disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 30 menit (Tuhuteru *et al.*, 2012).

Eksplan berupa daun yang diambil dari planlet *C. morifolium* hasil subkultur yang berumur 45 hari. Eksplan daun dipotong dengan ukuran ± 1 cm x 1 cm, kemudian ditanam dalam media perlakuan secara aseptik dalam laminar. Botol kultur yang berisi eksplan ditutup plastik tahan panas selanjutnya diinkubasi pada suhu 18°C - 27°C dan intensitas cahaya 2000 lux.

Analisis flavonoid total kalus

Analisis kadar flavonoid total dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Penyediaan ekstrak dilakukan dengan menimbang 0,05 g berat kering kalus dan diekstraksi menggunakan 5 mL etanol 95% dengan pengadukan 200 rpm selama 24 jam. Ekstrak kalus disaring kemudian filtrat ditambahkan etanol 80% hingga 25 mL dan diinkubasi selama 30 menit. Kurva kalibrasi dibuat menggunakan larutan standar kuersetin

pada konsentrasi 20, 40, 60, 80 dan 100 $\mu\text{g/mL}$. Larutan standar kuersetin yang diencerkan diambil 0,5 mL dan dicampurkan dengan 1,5 mL etanol 95%, 0,1 mL AlCl_3 10%, 0,1 mL CH_3COOK 1 M dan 2,8 mL akuades secara terpisah. Nilai absorbansi total flavonoid diukur pada panjang gelombang 415 nm. Blanko disiapkan dengan dipipet 0,5 mL etanol 95% dan masing-masing 2,8 mL AlCl_3 10% dan CH_3COOK 1 M (Chang *et al.*, 2002).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Warna, tekstur dan waktu muncul kalus

Salah satu indikator adanya pertumbuhan dalam kultur jaringan dengan Teknik *in vitro* adalah munculnya kalus pada eksplan. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa kalus pertama kali terbentuk pada sayatan eksplan daun krisan yang kontak dengan media tanam. Diawali dengan pembengkakan pada eksplan kemudian sayatan eksplan bergelombang (*swelling*) dan munculnya butiran kecil berwarna putih di sekitar eksplan daun yang dilukai (**Gambar 1**).

Hal ini sesuai dengan yang diungkapkan oleh Iwase *et al.* (2011) bahwa terbentuknya kalus diawali pada bekas luka irisan karena sebagian sel akan mengalami proliferasi pada permukaan irisan di atas medium dan meregenerasi organ baru atau jaringan baru.



Gambar 1. Pembentukan kalus pada eksplan daun krisan (*C. morifolium* Ramat)
Sumber. Dokumen Penulis.

Kalus merupakan massa sel yang tidak teratur atau belum terorganisasi (amorphous) dari sel-sel jaringan yang masih membelah diri secara terus menerus. Kalus dapat diproduksi dari satu sel yang berdiferensiasi karena seluruh sel kalus bersifat totipotensi (Stobbe *et al.*, 2002).

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa pada media tanam dengan penambahan air kelapa kalus mulai muncul pada hari keenam hingga kesembilan setelah tanam (6-9 HST), lebih cepat dibandingkan dengan medium tanpa air kelapa yang baru muncul pada hari ke-13 hingga hari ke-15 setelah tanam (13-15 HST). Pembentukan kalus pada perlakuan dengan penambahan air kelapa lebih cepat dibandingkan tanpa air kelapa disebabkan jaringan yang dikultur mendapatkan auksin dan sitokinin eksogen yang cukup untuk membentuk kalus (Rahayu, 2003), yang berasal dari 2,4-D sebagai sumber auksin dan air kelapa sebagai sumber sitokinin. Air kelapa memiliki kandungan diphenil

urea yang berfungsi sebagai sitokinin sehingga mampu mendorong induksi kalus dan senyawa-senyawa organik lainnya dalam air kelapa tersebut membantu dalam perkembangan dan pertumbuhan kalus (Hidayat, 2007).

Kalus yang terbentuk pada perlakuan 2,4-D tanpa dan dengan penambahan air kelapa memperlihatkan perbedaan warna kalus. Penyebab terjadinya perbedaan warna pada setiap perlakuan karena perbedaan fase perkembangan kalus (Rasud dan Bustaman, 2020). Warna kalus krisan dengan penambahan 2,4-D dan air kelapa dapat dilihat pada **Gambar 2**.

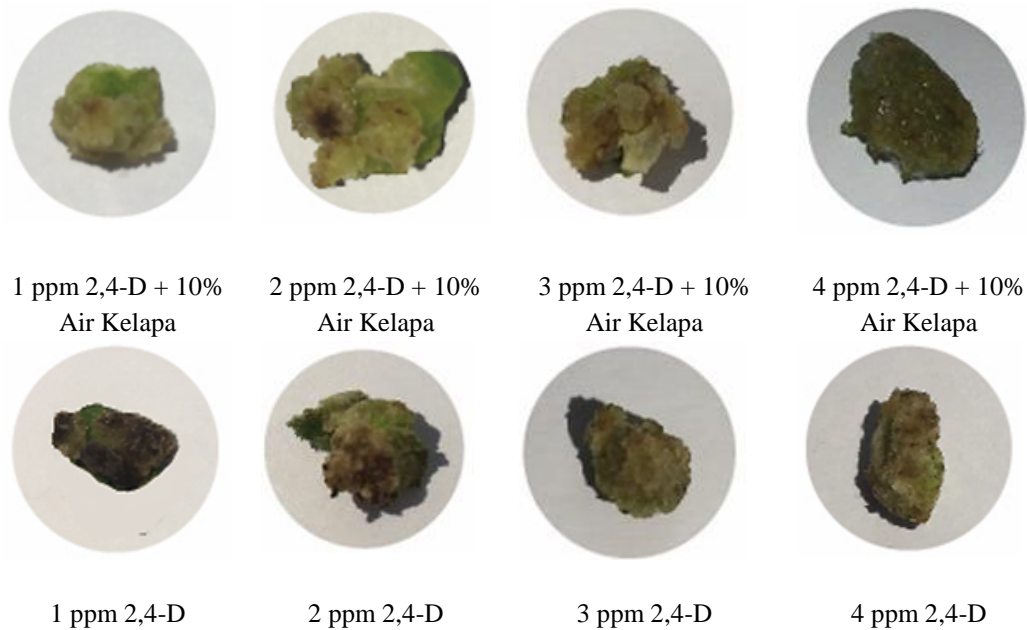
Hasil pengamatan visual menunjukkan bahwa kalus yang terbentuk menghasilkan warna yang bervariasi dari kehijauan, keputihan dan kecokelatan. Warna kehijauan pada kalus disebabkan adanya pembentukan klorofil (Leupin *et al.* 2000). Air kelapa yang mengandung sitokinin merangsang pembentukan klorofil sehingga terjadinya warna kehijauan pada kalus (Sari *et al.* 2011). Warna putih pada kalus menunjukkan massa sel-sel muda yang sedang aktif membelah (Yelnititis 2012). Kalus yang berwarna putih juga merupakan sel embrionik yang memiliki butir pati yang tinggi namun belum mengandung kloroplas (Ariati *et al.*, 2012). Perubahan warna pada kalus diduga sel-sel yang muda terus aktif membelah (putih) dan adanya

sintesis zat-zat fenolik (Rasud & Bustaman, 2020) yang menyebabkan kalus berwarna kecoklatan (*browning*).

Syammiah (2006), menyatakan bahwa penyebab *browning* karena senyawa fenol yang keluar dari eksplan dan akan teroksidasi membentuk sebuah larutan yang berwarna coklat (*quinon*) dan bersifat toksik akibat stress mekanik atau pelukaan pada eksplan. Proses terjadinya *browning* yaitu pada aktivitas enzim polifenol oksidase dan tyrosinase menghasilkan orto-diquinon yang bereaksi secara spontan dengan protein dan komponen seluler lainnya membentuk pigmen gelap disebut melanin (Tang *et al.*, 2001) yang mengandung senyawa fenolik (Karimi *et al.*, 2013). Setelah beberapa hari pelukaan eksplan terjadi, kondisi oksidatif

muncul dan enzim secara alami disintesis untuk mendorong sintesis fenol sebagai bahan bentuk pertahanan diri sebuah tanaman (Syabana *et al.*, 2015).

Penambahan 2,4-D dan air kelapa menghasilkan variasi warna kalus yang terbentuk, namun tidak terjadi perubahan pada tekstur kalus yang dihasilkan. Pada semua perlakuan penambahan 2,4-D dan air kelapa menghasilkan kalus bertekstur remah. Kalus remah merupakan kalus yang dapat tumbuh secara terpisah menjadi beberapa bagian kecil, mudah terputus, dan mengandung banyak air (Sitorus *et al.*, 2011). Menurut Yelnititis (2012), pengaruh ZPT 2,4-D dengan berbagai konsentrasi dapat mempengaruhi pembentukan kalus berwarna putih dan bertekstur remah (*friable*).



Gambar 2. Warna kalus krisan (*C. morifolium* Ramat) pada perlakuan penambahan 2,4-D dan air kelapa

Sumber. Dokumen penulis

Air kelapa juga diduga mempengaruhi warna dan tekstur pada kalus karena memiliki kandungan sitokinin alami sehingga mempengaruhi hormon eksogen pada kalus, seperti yang dilaporkan Latifah *et al.* (2017) bahwa penambahan 20% ekstrak air kelapa mempengaruhi pertumbuhan eksplan kalus anggrek menjadi warna putih dan remah (*friable*). Aplikasi kombinasi auksin sintetik dan sitokinin alami pada konsentrasi 2,4-D yang tepat mampu menghasilkan kalus dengan struktur remah berwarna putih.

Ukuran, berat basah dan berat kering kalus

Hasil ANAVA menunjukkan bahwa perlakuan 2,4-D dan air kelapa berpengaruh nyata terhadap ukuran diameter (ukuran), berat basah dan berat kering kalus. Hasil yang didapat kemudian diuji lanjut dengan Uji Jarak Berganda Duncan untuk melihat perbedaan antar perlakuan terhadap ukuran diameter kalus yang dapat dilihat pada **Tabel 1**.

Berdasarkan **Tabel 1**, ditunjukkan bahwa pada perlakuan air kelapa, diameter kalus meningkat sejalan dengan bertambahnya konsentrasi 2,4-D. Kombinasi 4 ppm 2,4-D + 10% air kelapa menghasilkan diameter kalus tertinggi yaitu 1,4 cm yang berbeda nyata dengan perlakuan lainnya. Menurut Hoesen *et al.* (2008), ZPT alami seperti air kelapa yang ditambahkan ke dalam media kultur berfungsi mengatur pertumbuhan dan perkembangan eksplan. Peran air kelapa dalam pembentukan kalus adalah untuk memacu pembelahan sel dan mendorong proses morfogenesis kalus. Penambahan auksin 2,4-D yang dikombinasikan dengan air kelapa akan memberikan pengaruh yang saling sinergis dalam pembentukan kalus. Auksin berfungsi dalam proliferasi sel (Huan *et al.* 2004) dan pemanjangan sel (Utami *et al.* 2007) dikenal mampu berperan untuk menginduksi, meningkatkan pembentukan dan pertumbuhan ukuran kalus (Rahayu *et al.*, 2003).

Tabel 1. Rata-rata berat basah dan berat kering kalus krisan (*C. morifolium* Ramat)

Perlakuan	Ukuran Kalus (cm)	Berat Basah (gram)	Berat Kering (gram)
1 ppm 2,4-D + 10% AK	1,05 ^b	0,10 ^{bc}	0,05 ^a
2 ppm 2,4-D + 10% AK	1,10 ^{bc}	0,12 ^{cd}	0,09 ^b
3 ppm 2,4-D + 10% AK	1,17 ^c	0,15 ^{de}	0,11 ^c
4 ppm 2,4-D + 10% AK	1,44 ^d	0,19 ^e	0,16 ^d
1 ppm 2,4-D	0,93 ^a	0,05 ^a	0,04 ^a
2 ppm 2,4-D	0,93 ^a	0,05 ^a	0,03 ^a
3 ppm 2,4-D	0,90 ^a	0,06 ^a	0,05 ^a
4 ppm 2,4-D (k _{0d4})	0,96 ^a	0,07 ^a	0,06 ^a

Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata menurut Uji Jarak Berganda Duncan taraf 5%

Tabel 1 menunjukkan pula bahwa rata-rata berat basah dan berat kering tertinggi terdapat pada perlakuan 4 ppm 2,4-D + 10% air kelapa berturut-turut sebesar 0,19 gram dan 0,16 gram yang berbeda nyata dengan perlakuan lainnya. Berat basah yang tinggi dengan penambahan air kelapa disebabkan kalus memiliki kandungan air yang tinggi serta kecepatan sel-sel nya dalam membelah diri, memperbanyak diri dan membesarnya kalus sangat efektif (Rahayu *et al.*, 2003).

Peningkatan berat kering kalus disebabkan oleh meningkatnya aktivitas metabolisme sel penyusun kalus (Wardani, 2004). Berat kering kalus tergantung pada kecepatan sel-sel tersebut membelah diri, memperbanyak diri yang dilanjutkan dengan pembesaran sel. Kecepatan sel membelah diri dapat dipengaruhi kombinasi 2,4-D dan air kelapa yang ditambahkan dalam media. Penambahan ZPT dapat diduga dapat mempengaruhi metabolisme RNA yang berperan dalam

sintesis protein melalui proses transkripsi molekul RNA. Peningkatan sintesis protein sebagai sumber tenaga dapat digunakan untuk pertumbuhan sehingga dapat meningkatkan berat kering kalus (Gunawan *et al.*, 1992). Pada medium yang digunakan pada penelitian memperoleh cukup bahan untuk membentuk biomassa berat kering disebabkan air kelapa yang mengandung karbohidrat (sukrosa, fruktosa dan glukosa) yang menyebabkan sel-sel kalus aktif membelah sehingga kalus dapat membentuk biomassa lebih banyak selama pertumbuhan (Suskendriyati, 2003).

Kadar flavonoid total kultur kalus krisan

Hasil ANAVA menunjukkan bahwa 2,4-D dan air kelapa berpengaruh nyata terhadap kadar flavonoid total. Hasil yang didapat kemudian diuji dengan Uji Jarak Berganda Duncan untuk melihat perbedaan antar perlakuan yang hasilnya dapat dilihat pada **Tabel 2**.

Tabel 2. Rata-rata kadar flavonoid total kalus krisan (*C. morifolium* Ramat)

Perlakuan	Kadar Total Flavonoid (mgQE/g BK)
1 ppm 2,4-D + 10% AK	0,954 ^{ab}
2 ppm 2,4-D + 10% AK	1,332 ^{bc}
3 ppm 2,4-D + 10% AK	1,569 ^{cd}
4 ppm 2,4-D + 10% AK	1,873 ^d
1 ppm 2,4-D	0,778 ^a
2 ppm 2,4-D	0,710 ^a
3 ppm 2,4-D	0,850 ^a
4 ppm 2,4-D	0,980 ^a

Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata menurut Uji Jarak Berganda Duncan taraf 5%

Pada **Tabel 2** menunjukkan rata-rata tertinggi kadar flavonoid total pada kalus dengan perlakuan 4 ppm 2,4-D + 10% air kelapa yaitu sebesar 1,873 mgQE/g BK sampel yang berbeda nyata dengan perlakuan lainnya. Pertumbuhan kalus dengan dosis auksin dan sitokinin dengan dosis yang optimal baik endogen maupun eksogen, diikuti oleh produksi metabolit sekunder yang tinggi pula (Indah dan Ermavitalini, 2013). Air kelapa sebagai sumber sitokinin berkontribusi dalam meningkatkan biosintesis metabolit sekunder. Hal ini dapat terlihat pada **Tabel 2** bahwa kandungan flavonoid pada perlakuan air kelapa lebih tinggi dibandingkan tanpa air kelapa pada konsentrasi 2,4-D yang sama. Hal ini disebabkan air kelapa pada media mengandung sukrosa, fruktosa dan glukosa sehingga nutrisi media memperoleh sumber energi untuk proses metabolisme dari gula yang ditambahkan ke dalam media dan dapat meningkatkan kandungan metabolit sekunder (Miyana *et al.*, 2000).

Orihara *et al.* (2002) melaporkan bahwa air kelapa dapat meningkatkan metabolit sekunder diterpenoid kultur *Torreya nucifera*. Penelitian lain menunjukkan bahwa peningkatan biosintesis senyawa metabolit sekunder dengan 2,4-D yang dikombinasikan air kelapa dilaporkan terjadi pula pada

Tinospora crisper L. (Sukmawati *et al.*, 2018).

Selain itu, kalus yang memiliki pertumbuhan yang baik akan diikuti produksi metabolit sekunder yang baik pula. Pertumbuhan kalus yang baik pada perlakuan 4 ppm 2,4-D menghasilkan kadar flavonoid tertinggi (**Tabel 1** dan **2**). Sesuai pernyataan Rahayu *et al.* (2003), penambahan 2,4-D dan air kelapa dalam dosis yang optimal pada media kultur akan merangsang pembelahan dan pembesaran sel pada eksplan sehingga dapat memacu pembentukan dan pertumbuhan kalus serta meningkatkan produksi senyawa kimia pada kalus.

Kandungan metabolit sekunder berkorelasi dengan berat kering jaringan yang dikultur. Berdasarkan **Tabel 2**, perlakuan 4 ppm 2,4-D + 10% air kelapa menghasilkan berat kering tertinggi. Berat kering dapat menunjukkan produktivitas tanaman karena 90% hasil metabolit tanaman terdapat dalam bentuk berat kering (Solichatun *et al.*, 2005). Akumulasi metabolit sekunder sejalan dengan akumulasi biomassa berat kering pada tanaman. Proses metabolisme pertumbuhan tanaman yang tinggi akan menghasilkan metabolit primer dalam jumlah yang berlebih sehingga dapat digunakan untuk sintesis metabolit sekunder (Jain *et al.*, 2012). Hal yang sama diperoleh pada kultur sel *Perilla* (Lu *et al.*, 2017), *Salvia*

santolinifolia (Bosis) (Jan *et al.*, 2015) dan *Sericostoma pauciflorum* (Jain *et al.*, 2012) yang memiliki produksi metabolit sekunder tinggi karena memiliki berat kering yang tinggi juga. Hal ini disebabkan pada kondisi medium yang memiliki nutrisi optimal, sel-sel kalus dapat menggunakan nutrisi dalam media tersebut untuk meningkatkan pertumbuhan dan pembentukan metabolit sekunder (Pan *et al.*, 2020), sehingga pada penelitian ini dapat diperoleh biomassa (berat kering) yang besar serta diikuti kadar flavonoid yang tinggi pula.

SIMPULAN

Berdasarkan pembahasan di atas, maka simpulan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Perlakuan 2,4-D + 10% air kelapa menghasilkan pembentukan kalus lebih cepat yaitu pada hari ke-6 hingga ke-9 setelah tanam dibandingkan tanpa air kelapa yaitu pada hari ke-13 hingga ke-15 setelah tanam.
2. Kombinasi perlakuan 4 ppm 2,4-D + 10% air kelapa menghasilkan pertumbuhan kultur kalus krisan (*C. morifolium* Ramat) terbaik dengan ukuran kalus sebesar 1,4 cm, berat basah kalus sebesar 0,19 gram dan berat kering kalus sebesar 0,16 gram serta kadar flavonoid total tertinggi sebesar 1,873 mgQE/g BK sampel.

DAFTAR PUSTAKA

- Ariati SN, W Waeniati, Muslimin, & IN Suwastika. 2012. Induksi tanaman kakao pada medium MS dengan penambahan 2,4-D. *Jurnal Natural Science*, 1(1): 74-84.
- Chang CC, MH Yang, HM Wen, & JC Chern. 2002. Estimation of total flavanoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J. Food Drug Anal*, 10 (3): 178-182.
- Dwi NM, Waenati, Muslimin, & IN Suwastika. 2012. Pengaruh penambahan air kelapa dan berbagai konsentrasi hormon 2,4-D pada medium MS dalam menginduksi kalus tanaman anggur hijau (*Vitis vinifera* L.). *Jurnal Natural Science*. 1(1): 53-62.
- Gunawan LW. 1992. Teknik Kultur Jaringan. Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman PAU Bioteknologi IPB, Bogor.
- Hidayat H. 2007. Induksi pertumbuhan eksplan endosperm ulin dengan IAA dan Kinetin. *Agritop*, 26(4):147-152.
- Hoesen DSH, Witjaksono dan LA Sukamto. 2008. Induksi kalus dan organogenesis kultur *in vitro* *Dendrobium lineale* Rofle. *Berita Biologi*, 9(3): 333-341.
- Huan LVT, T Takamura, & M Tanaka. 2004. Callus formation and plant regeneration from callus through somatic embryo structures in *Cymbidium* orchid. *Plant Science*, 166(6): 1443-1449.
- Indah PN & D Ermavitalini. 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): 2337-352
- Isah T, S Umar, M Mujib, MP Sharma, PE Rajasekharan, N Zafar, & A Fruk. 2018. Secondary metabolism of pharmaceuticals in the plant in vitro cultures: strategies, approaches and

- limitations to achieving higher yield. *J. Plant Cell Tiss Organ Cult*, 132: 239-265.
- Iwase A, M Ohme-Takagi, & K Sugimoto. 2011. WIND1: A key molecular switch for plant cell dedifferentiation plant signal. *Behav.* 6 (12): 1943-1945.
- Jain SM. 2012. Date palm biotechnology: current status and prospective-an overview. *Emir. J. Food Agric*, 24 (5): 386-399.
- Jan T, B Naqvi, R Qadri, & M Nisar. M. 2015. Effect of age of cultures and hormones on the synthesis of secondary metabolites from callus of *Salvia santolinifolia* (Boiss), a medicinal herb. *European Journal of Biotechnology and Bioscience*, 3(11): 19-22.
- Jung EK. 2009. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Chrysanthemum indicum* against oral bacteria. *J. Bacteriol*, 19(2): 61-69.
- Kalia R, JK Katnoria, & AK Nagpal. 2016. Antitumor activity of aqueous leaf extract of different cultivars of *Chrysanthemum* R. using potato disc tumor assay. *Journal Pharmaceutical Sciences and Research*, 8(11): 1262-1265.
- Karimi N, HR Ghasmpour, & M Yari 2014. Effect of different growth regulators on callus induction and plant regeneration of satureja species. *Annual Research & Review in Biology*, 4(16): 2646-2654.
- Kristina NN & SF Syahid. 2012. Pengaruh air kelapa terhadap multiplikasi tunas in vitro, produksi rimpang, dan kandungan xanthorizol temulawak di lapangan. *Jurnal Littri*, 18(3): 125-134.
- Latifah R, T Suhermiatin, & N Ermawati. 2017. Optimasi pertumbuhan plantlet *Cattleya* melalui kombinasi kekuatan media Murashige-Skoog dan bahan organik. *Jurnal Agriprima*, 1(1): 59-68.
- Lestari EG. 2011. Peranan Zat Pengatur Tumbuh dalam Perbanyak Tanaman melalui Kultur Jaringan. *Jurnal AgroBiogen*, 7(1): 63-68.
- Leupin E. 2000. Somatic embryogenesis from leaf callus devired from maturestress of the cycad *Ceratozamia hildae* (Gymnospermae). *Journal Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 40: 25- 31.
- Lu N, EL Bernardo, C Tipayadarapani, M Takagaki, N Kagawa, & W Yamori, W. 2017. Growth and accumulation of secondary metabolites in perilla as affected by photosynthetic photon flux density and electrical conductivity of the nutrient solution. *Frontiers in Plant Science Plant Breeding*, 8: 1-12.
- Miyana K, M Seki, & S Furusaki. 2000. Analysis of pigmentation in individual cultured plant cells using an image processing system. *Biotechnology Letters*, 22: 977-981.
- Mufarrikha L, N Herlina, & E Widaryanto 2014. Respon dua kultivar tanaman krisan (*Chrysanthemum morifolium*) pada berbagai lama penambahan cahaya buatan. *Jurnal Produksi Tanaman*, 2(1): 10-16.
- Orihara Y, JW Yang, N Komiya, K Koge, & T Yoshikawa. 2002. Abietane diterpenoid from suspension cultured cells of *Torreya nucifera* var. radicans. *Phytochemistry*, 59(4): 385-389.
- Pan Y, L Lin, S Xiao, Z Chen, S Sarsaiya, S Zhang, YS Guan, H Liu, & D Xu. 2020. Callus growth kinetics and accumulation of secondary metabolites of *Bletilla striata* Rchb.f. using a callus suspension culture. *PLoS ONE*, 15(2).
- Prakash NKU, S Bhuvaneshwari, N Sripriya, R Arulmozhi, K Kavitha, R Aravitha, & B Bharathiraja. 2014. Studie on phytochemistry, antioxidant, antibacterial, larvicidal, and pesticidal activities of aromatic plants from Yelagiri hills. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6(5): 1-4.

- Rahayu B, Solichatun, & E Anggarwulan. 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.
- Rasud Y & B Bustaman, B. 2020. Induksi kalus secara *in vitro* dari daun cengkeh (*Syzigium aromaticum* L.) dalam media dengan berbagai konsentrasi auksin. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*, 25 (1): 67-72.
- Razavi RM, H Arshneshin, & A Ghasemian. 2016. *In vitro* callus induction and isolation of volatile compounds in callus culture *Lallemantia iberica* (M. Beib.) Fisch. & C.A. Mey. *Journal of Plant Process and Function*, 5(18): 65-68.
- Rivai RR & H Helmanto. 2015. Induksi kalus *Chrysanthemum indicum* untuk meningkatkan keragaman genetik dari sel somatik. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon*, 1(1): 167-170.
- Sari YP, H Manurung, & Asipah., 2011. Pengaruh pemberian air kelapa terhadap pertumbuhan angrek kantong semar (*Paphiopedilum supardii* Braem & Loeb) pada media Knudson secara *in vitro*. *Mulawarman Scientifie*, 10(2): 219-231.
- Shofiyani A & N Damayanti. 2017. Pengaruh 2,4-D (Asam Diklorofenoksi Asetat) dan BAP (Benzyl Amino Purin) terhadap proliferasi kalus dan produksi metabolit sekunder dari kalus kencur (*Kaemferia galangal* L.). *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 15(2): 180-185.
- Sitorus EN, ED Hastuti, & N Setiari. 2011. Induksi kalus binahong (*Basella rubra* L.) secara *in vitro* pada media Murashige and Skoog dengan konsentrasi sukrosa yang berbeda. *J. Bioma*, 13(1): 1-7.
- Solichatun EA & E Anggarwulan. 2005. Pertumbuhan dan produksi reserpin kalus pule pandak (*Rauvolfia serpentine* (L.) Bentham ex. Kurz.) pada pemberian metil jasmonat secara *in vitro*. *Bioteknologi*. 2(2): 28-66.
- Stobbe H, U Schmitt, D Eckstein, & D Jujesiefken. 2002. Developmental stages and fine structure of surface callus formed after debarking of living lime trees (*Tilia* sp.). *Annals of Botany*. 89(6): 773-782.
- Sukmawati D, H Herlina, M Muslimin, & IN Suwastika. 2018. Induksi kalus dan metabolit sekunder tanaman brotowali (*Tinospora crispa* L.) pada medium MS dengan penambahan ZPT 2,4-D dan air kelapa secara *in vitro*. *Natural Science*. 7(2): 268-273.
- Sun QL, S Hua, JH Ye, XQ Zheng, & YR Liang. 2010. Flavonoids and volatiles in *Chrysanthemum morifolium* Ramat flower from Tongxiang country in China. *African Journal of Biotechnology*, 9(25): 3817-382.
- Suskendriyati H. 2003. Pertumbuhan dan Produksi Saponin Kultur Kalus *Talinum paniculatum* Gaertn. dengan Variasi Pemberian Sumber Karbon. *Skripsi*. Jurusan Biologi, FMIPA UNS, Surakarta.
- Syabana MA, I Rohmawati, & EP Ningsih. 2015. Pertumbuhan tanaman marasi (*Curculigo latifolia*) dengan perbedaan konsentrasi NAA (Naphthalene Acetic Acid) dan BAP (Benzyl Amino Purine) secara *in vitro*. *Jurnal Agroteknologi*. 7(1): 6-15.
- Syahid SF & Hernani. 2010. Pengaruh zat pengatur tumbuh terhadap pembentukan dan pertumbuhan serta kandungan sinensetin dalam kalus pada tanaman kumis kucing (*Orthosiphon aristatus*). *Jurnal Littri*. 7(4): 99-103.
- Syammiah S. 2006. Jenis senyawa organik suplemen pada medium Knudson C untuk pertumbuhan protocorm like bodies *Dendrobium Bertacong Blue* x *Dendrobium undulatum*. *J. Floratek*, 2(2): 86 - 92.
- Tang W, Z Guo, & F Ouyang. 2001. Plant regeneration from embryogenic

- cultures initiated from mature loblolly pine zygotic embryos. *In Vitro Cell. Dev. Biol.- Plant.* 37: 558-563.
- Tuhuteru S, L Raharjo, & SHT Raharjo. 2012. Pertumbuhan dan perkembangan anggrek *dendrobium anosmum* pada media kultur *in vitro* dengan beberapa konsentrasi air kelapa. *J. Agrologia.* 1(1): 1-12.
- Utami ESW, I Sumardi, Taryono, & E Semiarti. 2007. Pengaruh α -naphthaleneacetic acid (NAA) terhadap embriogenesis somatik anggrek bulan *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl. *Biodiversitas.* 8(4): 295-299.
- Wardani DP, Solichatun, & AD Setyawan. 2004. Pertumbuhan dan produksi saponin kultur kalus *talinum paniculatum* gaertn. pada variasi penambahan asam diklorogenoksi asetat (2,4-D) dan kinetin. *Jurnal Biofarmasi.* 2 (1): 35-43
- Yelnititis, Y. 2012. Pembentukan kalus remah dari eksplan daun rami (*Gonystylus bancanus* (Miq) Kurz.). *Jurnal Pemuliaan Tanaman Hutan.* 6(3): 181 – 194.
- Yong JWH, L Ge, YF Ng, & SN Tan. 2009. The chemical composition and biological properties of coconut (*Cocos nucifera* L.) water. *Molecules.* 14(12): 5144–5164.
- Zhong JJ. 2001. Biochemical Engineering of the Production of Plant Specific Secondary Metabolites by Cell Suspension Culture. In: *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, vol.72, ed. Th. Scheper, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.