II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Tempuyung (*Sonchus arvensis* L.)

Tempuyung (*Sonchus arvensis* L.) merupakan salah satu tumbuhan obat tradisional Indonesia yang banyak dimanfaatkan oleh masyarakat untuk pengobatan batu ginjal, anti-inflamasi, disentri, radang dan rematik. Tempuyung termasuk tanaman tahunan yang bergetah, tumbuh liar di tempat terbuka yang sedikit terkena sinar matahari. Tempuyung tumbuh subur pada tanah berpasir atau menempel pada batu (Hapsari dkk., 2018). Bentuk tanaman tempuyung dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Penampakan (A) tanaman tempuyung (*Sonchus arvensis* L.) dan (B) daun tempuyung (Ari dkk., 2016)

Batang tanaman tempuyung memiliki getah berwarna putih dengan percabangan monopodial dan batang berwarna hijau keputih-putihan, sedangkan akarnya berupa akar tunggang dan roset. Tempuyung memiliki dominasi apikal yang kuat sehingga pertumbuhan tunas aksilarnya lebih banyak dibandingkan tunas lateralnya. Tempuyung memiliki jenis daun tunggal, dimana pada bagian bawah membentuk roset akar. Daun tempuyung bentuk lonjong atau lanset dengan tepi daun bergelombang dan ujung runcing. Daun tempuyung memiliki panjang 5-50 cm, lebar 5-10 cm dan berwarna hijau (Wahyuni dkk., 2021).

Daun tempuyung bermanfaat sebagai anti-hiperurisemia, demam, kencing batu, usus buntu, dan batu ginjal. Kandungan kimia yang terdapat di dalam daun tempuyung, yaitu flavonoid, ion-ion mineral, kumarin, taraksasterol, inositol, dan asam fenolat. Daun tempuyung memiliki senyawa aktif yang potensial untuk dimanfaatkan sebagai obat (Gunarti dkk., 2021). Klasifikasi tanaman tempuyung menurut DEPKES RI (1989), sebagai berikut:

Kerajaan : Plantae
Divisi : Spermatophyta
Kelas : Dicotyledonae
Suku : Asteraceae
Marga : *Sonchus*
Jenis : *Sonchus arvensis* L.

B. Kalus

Kalus merupakan kumpulan massa sel yang tidak berbentuk dan tidak mengalami diferensiasi. Kalus terbentuk melalui pembelahan sel secara terus menerus melalui bekas luka irisan karena sebagian sel pada permukaan irisan akan mengalami proliferasi (Ikeuchi dkk., 2013). Pembentukan kalus pada jaringan luka dipacu oleh zat pengatur tumbuh auksin dan sitokinin endogen. Bagian eksplan yang terinisiasi membentuk kalus disebabkan oleh sel-sel yang kontak dengan media terdorong menjadi meristematik dan selanjutnya aktif mengadakan pembelahan seperti jaringan penutup luka (Fitriani dkk., 2019). Kalus dalam kultur *in vitro* dapat dihasilkan dari potongan organ yang telah steril dalam media yang mengandung auksin maupun sitokinin (Nurilmala, 2018).

Tekstur kalus dapat menjadi indikator kualitas kalus dengan mendeteksi keaktifan atau stagnasi pembelahan sel yang dilihat dari tekstur kalus yang dihasilkan. Tekstur kalus dibedakan menjadi 3, yaitu kalus kompak, remah dan

intermediet (Rasud dan Bustaman, 2020). Kalus kompak memiliki tekstur padat dan keras dengan susunan sel yang kecil dan sangat rapat, sedangkan kalus remah memiliki tekstur lunak dan tersusun dari sel-sel dengan ruang antar sel yang banyak (Wijawati dkk., 2019). Perpaduan antara kalus kompak dan kalus remah disebut sebagai kalus intermediet (Rasud dan Bustaman, 2020).

Warna kalus menjadi penggambaran tampilan visual dari sel-sel kalus sehingga dapat menjadi indikator tingkat keaktifan pembelahan sel. Kalus berwarna putih menandakan massa sel yang sedang aktif membelah, sedangkan kalus berwarna putih kekuningan menandakan massa sel yang menuju fase akhir pembelahan aktif (Rasud dan Bustaman, 2020). Kalus berwarna hijau menandakan bahwa terdapat sel-sel yang aktif membelah dan mengandung klorofil (Sinaulan dkk., 2019). Kalus berwarna kecoklatan menandakan massa sel menuju fase penuaan (Rasud dan Bustaman, 2020).

Ukuran kalus menunjukkan bahwa banyaknya sel yang terbentuk dari sel-sel jaringan awal yang membelah diri secara terus menerus. Ukuran kalus yang semakin besar menunjukkan bahwa semakin tinggi aktivitas dan jumlah sel-sel jaringan awal yang membelah diri (Fitriani dkk., 2019). Berat kalus yang dihasilkan tergantung pada kecepatan sel-sel tanaman dalam melakukan pembelahan, perbanyakan, dan dilanjutkan dengan membesarnya kalus (Setiawati dkk., 2020).

Kalus dibedakan menjadi dua jenis berdasarkan kemampuan morfogenesisnya, yaitu kalus embriogenik dan non-embriogenik. Kalus embriogenik umumnya memiliki ciri berwarna putih hingga kekuningan,

bertekstur remah (*friable*), kompak, nodular dan tampak mengilap atau transparan (Bhojwani dan Razdan, 1983). Sel-selnya bersifat meristematik, aktif membelah serta memiliki tingkat totipotensi tinggi sehingga mampu berkembang menjadi embrio somatik dan beregenerasi menjadi planlet atau tanaman utuh (Bidabadi dan Jain, 2020).

Kalus non-embriogenik biasanya berwarna kuning kecokelatan, bertekstur kasar, berair atau lembek, pertumbuhannya tidak terorganisasi serta memiliki kemampuan regenerasi yang rendah atau bahkan tidak mampu membentuk embrio somatik (Bhojwani dan Razdan, 1983). Perbedaan karakter tersebut menunjukkan bahwa kalus embriogenik memiliki kompetensi regeneratif yang lebih tinggi dibandingkan kalus non-embriogenik karena sel-selnya masih mempertahankan kemampuan untuk mengalami embriogenesis somatik dan organogenesis (Bidabadi dan Jain, 2020). Keberhasilan regenerasi tanaman sangat bergantung pada pembentukan kalus embriogenik karena tipe kalus ini mampu menghasilkan tunas, akar, hingga planlet normal dalam jumlah tinggi (George dan De Klerk, 2008).

C. Kultur Kalus

Kultur kalus merupakan metode kultur *in vitro* yang dapat dilakukan dari berbagai organ tumbuhan (Fitriani dkk., 2019). Kultur kalus bertujuan untuk memperoleh kalus dari eksplan yang diisolasi dan ditumbuhkan dalam lingkungan yang terkedali (Nurilmala, 2018). Kultur kalus dapat menghasilkan kalus dari eksplan yang diisolasi dan ditumbuhkan dalam lingkungan terkendali

yang dikenal dengan teknik kultur jaringan (Fitriani dkk., 2019). Kalus pertama kali terbentuk pada bekas sayatan eksplan yang mengalami kontak dengan media yang mengandung ZPT. Hal tersebut diawali dengan terjadinya pembengkakan pada eksplan, kemudian bekas sayatan eksplan akan melengkung atau bergelombang dan akhirnya muncul kalus (George dan Sherrington, 2007).

Fase pertumbuhan kalus adalah fase lag, fase eksponensial, fase linier, fase perlambatan, dan fase stasioner. Fase lag merupakan fase untuk mempersiapkan pembelahan sel, fase eksponensial merupakan fase dimana laju pembelahan sel paling tinggi. Fase linier merupakan fase dimana sel membelah mulai melambat tetapi laju perkembangan sel meningkat, fase perlambatan merupakan fase dimana laju pembelahan sel dan pemanjangan sel menurun. Fase stasioner merupakan fase dimana jumlah dan ukuran sel tidak mengalami peningkatan atau penurunan (Purnamaningsih dan Ashrina, 2011).

Sumber kontaminan pada media pertumbuhan kalus dapat disebabkan oleh bakteri dan jamur. Kontaminasi media kultur akibat jamur memiliki ciri-ciri seperti terbentuknya lapisan hifa berwarna putih atau putih kelabu hitam pada permukaan media yang terkontaminasi (Andriani dan Heriansyah, 2021). Kontaminasi media kultur akibat bakteri memiliki ciri-ciri, yaitu perubahan warna dari bening kemudian menjadi abu-abu kemudian menjadi oranye kecoklatan pada bagian permukaan media dan timbul bercak lendir bewarna putih pada media maupun eksplan (Nofrianinda dkk., 2017).

D. Zat Pengatur Tumbuh

Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) merupakan senyawa organik yang terbentuk secara alamiah (fitohormon) maupun sintesis (rekayasa kimia), yang berfungsi memodifikasi serta meregulasi berbagai mekanisme fisiologis pada tanaman. Zat pengatur tumbuh secara umum terbagi menjadi lima golongan, yaitu auksin, sitokinin, giberelin, etilen, dan asam absisat (Campbell dan Reece, 2012). Zat pengatur tumbuh yang umum digunakan dalam induksi kalus, yaitu ZPT golongan auksin dan sitokinin (Gunawan,1987).

ZPT sintetis dirancang memiliki struktur yang menyerupai versi alaminya sehingga dapat mengaktivasi jalur respon spesifik pada tumbuhan (Dansih dkk., 2024). Sitokinin lebih dominan berperan dalam germinasi biji, pertumbuhan dan inisiasi tunas, sedangkan auksin menjadi kunci utama dalam induksi kalus embriogenik melalui diferensiasi sel dan elongasi. Auksin memicu terjadinya akumulasi faktor transkripsi *Somatic Embryogenesis Receptor Like Kinase 1* (SERK1) (Joshi dkk., 2022).

Efektifitas akumulasi SERK1 sangat bergantung pada konsentrasi auksin yang digunakan karena kadar auksin yang terlalu tinggi dapat menghambat pembentukan kalus embriogenik akibat peningkatan asam giberalat. Keseimbangan ini dapat dicapai melalui faktor transkripsi *AGAMOUS-LIKE15* (AGL15) yang muncul pada konsentrasi senyawa auksin yang terbaik untuk mengontrol sintesis asam giberelat (Joshi dkk., 2022).

Kemampuan kombinasi ZPT 2,4-D dan kinetin dalam menginduksi kalus dibuktikan pada penelitian yang dilakukan oleh Al-Khater dan Neamah (2023),

yang menunjukkan bahwa perlakuan terbaik untuk menginduksi kalus pada eksplan kotiledon bunga matahari dalam medium MS adalah kombinasi ZPT 2,4-D 1 ppm dan kinetin 0,75 ppm. Penelitian yang telah dilakukan oleh Abraham dan Thomas (2015), juga menunjukkan bahwa variasi terbaik untuk induksi kalus pada eksplan daun tapak liman dalam medium MS adalah kombinasi ZPT 2,4-D 0,5 ppm dan kinetin 0,5 ppm. Penelitian yang telah dilakukan oleh Okello dkk. (2021), menunjukkan bahwa kombinasi perlakuan terbaik untuk induksi kalus pada eksplan daun bunga matahari liar (*Aspilia africana*) dalam medium MS adalah kombinasi perlakuan dengan 2,4-D 1 ppm dan kinetin 1 ppm.

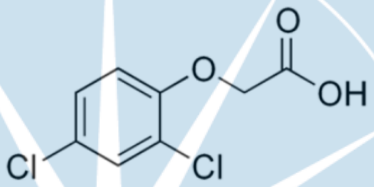
1. ZPT 2,4-D*ichlorophenoxyacetid Acid* (2,4-D)

ZPT 2,4-D merupakan hormon auksin sintetis yang umum digunakan dalam kultur jaringan tumbuhan, berfungsi untuk merangsang pertumbuhan tanaman, menginduksi pembelahan sel, dan pembentukan kalus. ZPT 2,4-D dipilih karena memiliki sifat yang lebih stabil, mudah diserap oleh eksplan, tidak mudah terurai oleh enzim yang dikeluarkan tanaman, dan tidak mudah terurai oleh pemanasan saat sterilisasi. ZPT 2,4-D juga berfungsi sebagai auksin yang kuat sehingga dapat mendorong terjadinya aktivitas morfogenetika (Khalida dan Noli, 2019).

Penggunaan ZPT 2,4-D dengan konsentrasi rendah akan lebih baik dalam menginduksi kalus dibandingkan dengan konsentrasi tinggi. Hal ini disebabkan karena ZPT 2,4-D mempunyai sifat fitotoksik yang sangat tinggi bila konsentrasinya berlebihan dalam tanaman (Fitriani dkk., 2019).

Penambahan 2,4-D dan kinetin tidak berpengaruh terhadap waktu muncul kalus, namun memberikan pengaruh nyata terhadap bobot kering kalus (Fitriandi dkk., 2023).

ZPT 2,4-D memiliki struktur kimia $C_8H_6Cl_2O_3$. Struktur tersebut terbentuk dari komponen yang terdiri dari cincin fenoksi dengan dua atom klorin (di posisi nomor 2 dan 4) yang terikat pada rantai asam asetat. Struktur molekul 2,4-Diklorofenoksiasetat dapat dilihat pada Gambar 2.



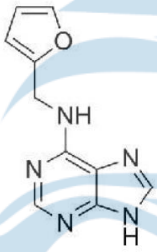
Gambar 2. Struktur molekul 2,4-D (Sumber: PubChem, 2025)

ZPT 2,4-D menginduksi pembentukan kalus melalui mekanisme diferensiasi sel dengan memprogram ulang sel-sel somatik dewasa menjadi sel meristematik yang aktif membelah (Ikeuchi dkk., 2013). ZPT 2,4-D termasuk auksin sintetik yang stabil dan tidak mudah terdegradasi oleh enzim *IAA-oksidase* sehingga konsentrasinya dalam jaringan tetap terjaga untuk memicu pelonggaran dinding sel dan peningkatan sintesis asam nukleat. Interaksi antara 2,4-D dengan reseptor protein seluler mengaktivasi faktor transkripsi yang mengatur siklus sel dan memaksa proliferasi sel secara berkelanjutan tanpa membentuk organ fungsional. Proses tersebut menghasilkan massa sel amorf yang dikenal sebagai kalus (George dan De Klerk, 2008).

2. ZPT kinetin (6-*furfurylaminopurine*)

Kinetin merupakan zat pengatur tumbuh golongan sitokinin yang banyak digunakan dalam kultur jaringan tanaman. Kinetin dapat meningkatkan pembelahan dan diferensiasi sel. Kinetin termasuk salah satu sitokinin yang paling banyak digunakan dalam kultur *in vitro*, selain benzyladenine dan zeatin (Andriani dkk., 2023).

Kinetin paling sering digunakan karena harganya yang relatif lebih murah bila dibandingkan dengan jenis sitokinin lainnya dan mempunyai aktivitas yang lebih tinggi daripada sitokinin alami (Andriani dkk., 2023). ZPT kinetin memiliki struktur kimia $C_{10}H_9N_5O$. Struktur molekul 6-*furfurylaminopurine* dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Struktur molekul kinetin (Sumber: PubChem, 2025)

Kinetin berperan sebagai regulator kunci dalam sitokinesis dengan memicu transisi fase G_2 ke fase M pada siklus sel melalui aktivasi kompleks *Cyclin-Dependent Kinase* (Mok dan Mok, 2001). Mekanisme induksi kalus oleh kinetin bergantung pada sinergi bersama auksin, kinetin mengoordinasi pembelahan sitoplasma setelah auksin memicu replikasi DNA. Penambahan kinetin dalam media kultur juga dapat mempercepat laju proliferasi sel amorf (George dan De Klerk, 2008).

E. Sterilisasi Eksplan

Sterilisasi eksplan merupakan tahapan krusial dalam kultur jaringan untuk mengantisipasi risiko kontaminasi yang dapat mencapai 95% tanpa proses disinfeksi yang tepat. Urgensi disinfeksi ini menjadi semakin tinggi pada eksplan yang diambil langsung dari alam akibat besarnya paparan jamur dan bakteri lapangan pada permukaan eksplan. Sifat biologis tanaman yang rentan terhadap panas ekstrem mengharuskan jaringan lunak seperti daun dan tangkai daun disterilisasi secara kimiawi menggunakan kombinasi bahan sterilan seperti alkohol 70–80%, detergen, fungisida, bakterisida, Tween-20, serta sodium hipoklorit (Nugrahani, 2022).

Formulasi dan durasi paparan bahan kimia tersebut tidak bersifat baku akibat perlunya penyesuaian dengan karakteristik morfologi dan kondisi fisiologis eksplan yang digunakan. Kunci utama keberhasilan sterilisasi permukaan ini terletak pada perendaman total seluruh permukaan daun untuk mengeliminasi mikroorganisme secara efektif, sekaligus menjaga keseimbangan agar konsentrasi zat kimia tidak merusak viabilitas sel mesofil daun. Pembilasan akhir menggunakan akuades steril sekurang-kurangnya tiga kali menjadi regulasi mutlak untuk menghilangkan residu bahan kimia berbahaya yang dapat memicu klorosis, *browning*, atau menghambat pertumbuhan eksplan daun pada media kultur (Nugrahani, 2022).

Kemampuan kombinasi tingkat konsentrasi klorox dan waktu perendaman dalam meningkatkan *survival rate* eksplan dibuktikan pada penelitian yang dilakukan oleh Wahyuni dkk. (2020), yang menunjukkan bahwa perlakuan

terbaik untuk sterilisasi pada eksplan daun tempuyung adalah kombinasi klorox 10% selama 10 menit. Penelitian yang telah dilakukan oleh Nugrahani (2022), juga menunjukkan bahwa variasi terbaik untuk sterilisasi eksplan daun krisan adalah kombinasi klorox 5% selama 10 menit. Penelitian yang telah dilakukan oleh Ogbimi dkk. (2024), menunjukkan bahwa kombinasi perlakuan terbaik untuk sterilisasi pada eksplan daun bayam perak adalah kombinasi perlakuan dengan klorox 5% selama 9 menit.

F. Biomassa

Biomassa merupakan berat kering dari kalus yang digunakan sebagai salah satu indikator pertumbuhan untuk melihat pengaruh variasi konsentrasi ZPT 2,4-D dengan kinetin. Biomassa diukur dengan menghitung berat kering kalus yang dihasilkan dari pengeringan kalus hasil induksi. Biomassa pada umumnya diukur dengan satuan gram (g), namun apabila berat kering yang dihasilkan terlalu kecil dapat menggunakan satuan miligram (mg) (Eddijanto dkk., 2022).

G. *Browning*

Browning merupakan fenomena oksidasi senyawa fenolik oleh enzim polifenol oksidase (PPO) yang menyebabkan eksplan (jaringan tanaman) dan media kultur berubah warna menjadi cokelat atau hitam, yang sering kali berujung pada kematian jaringan (Tilley dkk., 2023). *Browning* dipicu oleh aktivitas enzim oksidase yang mengandung tembaga seperti polifenol oksidase dan tirosinase yang dilepaskan ketika jaringan eksplan dilukai (Lante dkk.,

2016). Stres fisik akibat proses pemotongan pada jaringan eksplan memicu peningkatan aktivitas enzim *Phenylalanine Ammonia Lyase* (PAL). Aktivasi enzim ini kemudian menstimulasi biosintesis senyawa fenilpropanoid di dalam jaringan tersebut. Oksidasi yang terakumulasi kemudian menyebabkan perubahan warna menjadi coklat kehitaman yang berisiko menghentikan proses regenerasi hingga menyebabkan mortalitas pada eksplan (Tilley dkk., 2023).

Pencegahan *browning* sangat bergantung pada penentuan ambang batas konsentrasi dan waktu perendaman klorox yang terbaik. Penggunaan klorox umumnya tidak melebihi konsentrasi 15% karena klorox yang terlalu pekat akan membakar jaringan mesofil daun, memicu *browning* dan menyebabkan eksplan mengalami nekrosis. Waktu perendaman dengan klorox umumnya lebih dari 5 menit, tergantung pada besar konsentrasi yang dipakai dan ketebalan serta jenis eksplan (George dan De Klerk, 2008).

H. Hipotesis

1. Konsentrasi perendaman klorox 10% dan waktu perendaman 10 menit diduga dapat meningkatkan *survival rate* eksplan daun tempuyung.
2. Kombinasi 2,4-D 1 ppm dan kinetin 1 ppm diduga dapat menginduksi kalus embriogenik daun tempuyung.
3. Eksplan daun tempuyung diduga mampu mengalami proses dediferensiasi yang ditandai dengan perubahan morfologi berupa pembengkakan jaringan, pelengkungan, dan bergelombangnya bagian bekas sayatan hingga membentuk kalus embriogenik dengan karakteristik tekstur remah, warna

kuning, serta struktur sel berukuran kecil dengan inti dan sitoplasma yang terlihat jelas.