Prosiding Seminar Nasional Lingkungan Lahan Basah
Volume 4 Nomor 1 Halaman 72-77 April 2019

p-ISSN 2623-1611
e-ISSN 2623-1980

PROSPEK PENGEMBANGAN KALUS SIRIH HUTAN (*Piper aduncum* L) SEBAGAI BAHAN LARVASIDA NYAMUK *Aedes aegypti*

Ratna Kusuma [1] *, S. Sudrajat [1], R. Kartika [2]
[1]Biology Department, Faculty of Mathematic and Natural Sciences, Mulawarman University, Samarinda, Indonesia
[2]Department of Chemistry, Faculty of Mathematic and Natural Sciences, Mulawarman University, Samarinda, Indonesia
*Penulis koresponden: ratna.kusuma@gmail.com

Abstract

This study aims to determine the effectiveness of sucrose in a concentration of 30 g/L, 60 g/L, 90 g/L, and 120 g/L on the growth of the Betel Forest *Piper aduncum* L plant callus through the initiation of in vitro culture. Qualitative data was obtained from the morphology of callus growth. At initiation using Murashige and Skoog (MS) medium with the addition of a growth regulator 2,4-Dikloro phenoxyacetate 2 mg/L + Kinetin 2 mg/L. The results showed that callus from different sucrose concentrations had different color and callus texture. The administration of 30 g/L sucrose produced a greenish-white crust-textured callus, while at 60 g/L sucrose treatment, 90 g/L and 120 g/L textured crumbs with blackish brown color.

Keywords: In vitro*, Piper aduncum* L*,* Sucrosa, Callus production

1. PENDAHULUAN

Pengembangan tanaman obat dan obat tradisional merupakan prioritas nasional untuk mengurangi ketergantungan impor terhadap bahan baku obat sintetik. Beberapa penyakit yang saat ini masih merupakan satu dari problema kesehatan, adalah penyakit demam berdarah (DBD). Di taksir sekitar 2.5 milyar penduduk saat ini memiliki risiko terhadap *dengue fever* (DF), DHF, dan *dengue shock syndrome* (DSS). Keberhasilan upaya pengembangan vaccine virus dengue masih menemui kendala karena nyamuk *Aedes aegypti* telah beradaptasi dengan lingkungan dan bersifat *resiliensi*, yang menyebabkan proses pemberantasannya sangat sulit.Telur bisa bertahan dalam jangka lama selama beberapa bulan di lingkungan tanpa air. Dalam upaya penanganan penyakit demam berdarah dibutuhkan larvasida yang efektif, efisien, ramah lingkungan, dan tidak memberikan efek toksisitas tinggi terhadap organisme non target. Satu nilai angka taksiran terhadap kasus infeksi demam berdarah adalah 390 juta pertahun (antara 284–528 juta), dan sebanyak 96 juta (67–136 juta) dengan manifestasi klinis bervariasi. Studi lain melaporkan bahwa, nilai angka prevalence dengue, ditaksir sebanyak 3.9 milyar orang di 128 negara yang memiliki resiko terinfeksi oleh virus dengue (WHO 2009; WHO 2017).

Semakin meluasnya penyebaran penyakit, maka diperlukan Pengendalian vektor pada penggunaan insektisida serangga terhadap larva nyamuk. Larvasida seperti temephos organofosfat telah banyak digunakan. Bahan insektisida ini telah diberlakukan sebagai program kesehatan masyarakat dan terbukti memiliki efektifitas yang tinggi untuk menurunkan jumlah vektor nyamuk, namun karena penggunaannya yang berulang-ulang telah menimbulkan resistensi dari nyamuk tersebut. Oleh karena itu, diperlukan upaya pencarian terhadap bahan-bahan insektisida ramah lingkungan dan mudah terurai dengan percobaan mengembangkan salah satu insektisida alternatif dari ekstrak tumbuhan. Larvasida yang ideal haruslah efektif, efisien, ramah lingkungan, dan tentunya tidak memberikan efek toksisitas yang tinggi terhadap organisme non target. Tumbuhan sirih hutan *Piper aduncum* L*,* merupakan satu dari tumbuhan yang dapat diharapkan dapat menjadi insektisida. Masalah yang dihadapi, belum banyaknya referensi yang memuat budidaya dari tanaman ini. Kajian pengembangan dan penggunaan teknik mikropropagasi yang tepat seperti kultur jaringan diharapkan dapat membantu pengembangan budidaya tanaman sirih hutan.

Selama dalam periode tertentu, beberapa insektisida botani telah digunakan di berbagai negara seperti penggunaan kunyit, Pyrethrum, Derris, Quassia, Nikotin, Hellebore, Anabasine, Azadirachtin, kamper d-limonene, terpentin (Shaalan *et al*. 2005). Larvasida botani pada dasarnya adalah terdiri atas metabolit sekunder yang berfungsi sebagai alat mekanisme pertahanan tanaman untuk menahan tekanan dari predator herbivora dan faktor lingkungan lainnya. Beberapa

© Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat, Universitas Lambung Mangkurat

p-ISSN 2623-1611
e-ISSN 2623-1980

kelompok fitokimia seperti alkaloid, steroid, terpenoid, minyak atsiri dan fenolat dari tumbuhan yang berbeda telah dilaporkan memiliki insektisida. Efek insektisida ekstrak tumbuhan bervariasi tidak hanya menurut spesies tanaman, spesies nyamuk, varietas geografis dan suku cadang yang digunakan, tetapi juga karena metodologi ekstraksi yang diadopsi dan polaritas pelarut yang digunakan selama ekstraksi.

Setiap jenis tumbuhan merupakan sumber bahan kimia hayati (*chemical resources*), sehingga keanekaragaman hayati dipandang sebagai suatu industri atau pabrik bahan kimia yang berproduksi sepanjang tahun menghasilkan bahan kimia berguna (*chemical prospectives*) melalui proses rekayasa bioteknologi alami. Potensi tumbuhan bahan obat-obatan erat kaitannya dengan jenis bahan kimia yang dikandungnya seperti beberapa jenis asam amino, alkaloid, glikosida dan senyawa lain yang bersifat racun (Ascher dan Reynold 2002).

Gottlieb *et al*. (1981), Bernard *et al.* (1995), Baldoqui *et al*. (1998) melaporkan bahwa daun *Piper* spp. (Piperaceae) menghasilkan zat bioaktif antara lain zat phenylpropanoids, lignoids, alkaloid, chromenes, dihydrochalcones, flavonoids, dan turunan asam benzoat dan flavonoids. Senyawa phenylpropanoid ini bersifat insektisida, khususnya senyawa dimethoxy-4,5-methylenedioxy-allylbenzene (dillapiol). Olivera (2013) melaporkan bahwa minyak essensial dari hasil ekstraksi teradap daun *P. aduncum* mengandung 23 senyawa (monoterpen; 90,4% dan sesquiterpen 7,0%), dengan komponen utama adalah senyawa 1,8-cineole (53,9%).

Silva *et al*. 2009 melaporkan bahwa ekstrak *P. aduncum* berbentuk minyak esensial hidro-distilat (94,84% dillapiole) hasil ekstraksi daun menggunakan pelarut heksan bersifat toksis terhadap larva kutu sapi Rhipicephalus selama 14-21 hari sebesar 9,30 mg/mL dan mampu mengurangi kapasitas reproduksinya antara 12,48-44,22%, sedangkan pada konsentrasi 1 mg/L minyak atsiri menginduksi 100% mortalitas pada larva. Santana *et al.* (2014) melaporkan bahwa ekstrak daun bersifat larvasida terhadap *A. aegypti* dengan komponen utama senyawa kimia aktifnya adalah (E)-isocroweacin (29.52%), apiole (28.62%), dan elemicin (7.82%). Daya toksisitas akutnya(LC_{50}) antara 34-55 ppm dan LC_{90}nya > 100 ppm dalam bentuk *essential oils.*

Elfina *et al.* (2015), melaporkan bahwa ekstrak tepung daun sirih hutan mampu mengendalikan penyakit antraknosa yang disebabkan oleh jamur *C. capsici* dan memberikan pengaruh yang berbeda-beda terhadap pertumbuhan dan perkembangan jamur C. capsici. Sudrajat *et al.* (2010, 2011) melaporkan bahwa ekstrak daun sirih hutan bersifat racun terhadap larva nyamuk *A. aegypti.* Nilai (LC50) ekstrak daun sirih hutan terhadap larva nyamuk *A. aegypti* untuk waktu 48 jam, 36 jam, 24 jam dan 12 jam berturut-turut adalah 0,12%, 0,25%, 0,61% dan 0,83%.

Informasi di atas menggambarkan bahwa tumbuhan ini memiliki potensi besar untuk dieksplorasi secara ekonomi karena penggunaan minyak esensial telah terbukti di bidang pertanian dan kesehatan manusia. Sudrajat *et al.* (2011, 2012) melaporkan bahwa kehadiran *P. aduncum* yang ditemukan di areal-areal terbuka bekas hutan sekunder, bersifat kosmopolitan, cepat tumbuh, dan mendominasi kawasan-kawasan hutan terdegradasi dan lahan terlantar. Kondisi alam yang menunjukkan potensi sumberdaya alam hayati yang melimpah sebagai sumber insektisida hayati mendorong untuk dilakukannya pengembangan *P. aduncum* sebagai sumber bahan larvasida organik.

Seiring dengan hal diatas, perlu dilakukan usaha, salah satunya melalui teknik propagasi kultur jaringan tanaman dalam memproduksi tumbuhan sirih hutan tersebut. Cara ini diharapkan dapat produksi tanaman dalam jumlah besar. Penggunaan teknik kultur telah banyak dikembangkan untuk mendapatkan metabolisme sekunder, seperti senyawa aktif untuk industri farmasi dan kosmetik, hormon, enzim, protein, antigen, bahan tambahan pangan dan pestisida alami dari pemanenan kultur sel atau jaringan (Terrier *et al*. 2007). Bioteknologi menawarkan kemungkinan mengeksploitasi sel, jaringan, organ atau seluruh organisme dengan menumbuhkan mereka secara in vitro dan manipulasi genetik untuk mendapatkan senyawa yang diinginkan (Raq and Ravishanker 2002).

Teknik kultur jaringan atau kultur in vitro (Yusnita 2003), membantu proses produksi metabolisme sekunder yang dibedakan atas, produksi kultur organ dan produksi kultur kalus. Kultur organ seperti akar dan pucuk dapat mengahsilkan senyawa metabolit yang berbeda, senyawa sekunder, contohnya, alkaloid tropane hyoscyamine dan scopolamine diproduksi cukup baik di kultur akar (Fazilatun *et al*. 2004). Kultur pucuk biasanya digunakan untuk menunjukan penekanan dari produksi komersil dari senyawa sekunder utama pada tanaman alami (Khanam *et al.* 2000) atau untuk menginduksi variasi somaklonal in vitro dan untuk memilih produk sekunder penting yang dihasilkan klon (Dhawan *et al.* 2003), sedangkan secara kultur jaringan dengan kultur kalus artinya, pendekatan ini relatif sering digunakan untuk produksi flavonoid.

© Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat, Universitas Lambung Mangkurat

p-ISSN 2623-1611
e-ISSN 2623-1980

Beberapa faktor yang mempengaruhi keberhasilan kultur jaringan adalah media tanam, zat pengatur tumbuh, sumber eksplan yang digunakan dan faktor lingkungan. ZPT merupakan senyawa organik bukan hara yang dalam konsentrasi rendah dapat menstimulir atau memacu dalam pertumbuhan kultur jaringan.

Berdasarkan uraian di atas maka fokus penelitian ditujukan pada inisiasi dan multiplikasi penanaman secara in vitro *P.aduncum.* Dengan diperolehnya data kuantitatif mengenai unsur-unsur hara yang terdapat di dalam kalus in vitro, diharapkan dapat menjadi upaya dalam penyediaan senyawa larvasida yang diperlukan. Pengaruh perlakuan variasi unsur hara dalam media terhadap komposisi senyawa metabolit sekunder dan perbandingan daya toksisitas ekstrak kalus dibandingkan dengan ekstrak tumbuhan alami akan sangat bermanfaat dalam merencanakan pembangunan hutan tanaman industri yang berkelanjutan, terutama sebagai penyediaan baku larvasida organik di masa mendatang.

2. METODE

2.1 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan adalah: *Laminar air flow cabinet* merk ESCO, *autoclave* merk Tomy SX-700, *incubator*, pH meter, *hot plate*, botol kultur, cawan petri, *beaker glass*, gelas ukur, labu ukur, spatula, *erlenmeyer*, plastik (*cling wrap*), lampu spiritus, pinset, skapel, *freeze drying* (Christ Alpha 1-2 LD), *rotary evaporator* (Buchi The RII), corong pisah, neraca analitik, mikropipet.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah: tunas nodul dan tunas pucuk sirih hutan, media MS (Murashige dan Skoog), agar, sukrosa, zat pengatur tumbuh kinetin, 2,4-Dikloro fenoksiasetat (2,4-D), kinetin, alkohol 95%, bayclin, fungisida Dithane M-45 dan bakterisida Agrept 20-WP, detergent, betadin, NaOH 0,1 N, HCl 0,1 N, akuades, H_2SO_4 2 M, HCl pekat, pereaksi *Lieberman-Burchard* (CH_3COOH glasial:H_2SO_4 pekat), $FeCl_3$ 1%, pereaksi *dragendroff* (campuran $Bi(NO_3)_2.5H_2O$ dalam asam nitrat dan KI), serbuk Mg.

2.2 Pembuatan Media

Alat-alat gelas dan *dissecting set* disterilkan dengan menggunakan *autoclave* pada suhu 121ºC selama 30 menit. Pembuatan media MS0 (tanpa penambahan zat pengatur tumbuh) dilakukan menurut Yusnita (2003). Pembuatan media MS0, dengan penambahan zat pengatur tumbuh 2,4 D 2 mg/L + Kinetin 2 mg/L.

2.3 Penanaman Eksplan

Sterilisasi Pucuk Nodul/Pucuk Tanaman. Nodul pucuk dicuci dengan detergen, direndam dalam larutan fungisida dan bakterisida selama 30 menit, di cuci dengan air mengalir selama 30 menit. Kemudian sterilisasi dilakukan di dalam *laminar flow cabinet*, biji dimasukkan dalam larutan alkohol 70% kira-kira 1 menit, aquadest steril selama 5 menit, larutan bayclin 30% selama 10 menit, bayclin 20% selama 10 menit, bayclin 10% selama 10 menit, dan direndam dengan aquadest sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit.

Penanaman Nodul Pucuk. Nodul pucuk yang telah steril selanjutnya ditanam dalam media perkecambahan (MS0) dan diinkubasi dalam ruang kultur dengan intensitas cahaya ±1000-2000 lux, sebagai sumber eksplan untuk pembentukan kalus. Sumber eksplan yang digunakan dapat berupa kotiledon, tunas batang akar dan biji.

Pembentukan Kalus. Eksplan ditanam pada media perlakuan dan diinkubasi dalam ruang kultur dengan intensitas cahaya ±1000-2000 lux dan suhu 20-25ºC selama 4 bulan. Sumber eksplan yang menghasilkan perkembangan kalus terbaik, dilanjutkan dengan penambahan sukrosa.

2.4 Perlakuan Sukrosa

Kalus seberat 0,5 g yang ditimbang, dimasukkan ke dalam media MS dengan penambahkan sukrosa pada konsentrasi yang berbeda (30, 60, 90, dan 120 g). Setelah 3 bulan pengamatan, kalus pada masing-masing perlakuan diuji kandungan fitokimianya (secara kualitatif).

2.5 Analisa Data

Data kualitatif yang diperoleh disajikan secara deskriptif, sedangkan data kuantitatif disajikan dalam mean ± SE (*Standard Error*). Mean data hasil pengamatan pada kalus dianalisis menggunakan uji analisis varian (Anava) satu arah, untuk mengetahui adanya beda nyata. Jika ada beda nyata, maka uji dilanjut dengan menggunakan uji *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) pada taraf α = 5%. Baik Uji ANAVA maupun DMRT dilakukan dengan menggunakan program perangkat lunak SPSS versi 20 (SPSS Inc., USA).

© Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat, Universitas Lambung Mangkurat

p-ISSN 2623-1611
e-ISSN 2623-1980

2.6 Indikator Keberhasilan

Indikator keberhasilan meliputi: a) Diperolehnya kalus terbaik tanaman sirih hutan dari beberapa sumber eksplan yang digunakan. b) Diperolehnya konsentrasi optimum sukrosa, zat pengatur tumbuh dan unsur hara lain yang ditambahkan ke dalam media untuk mendukung proses pertumbuhan sirih hutan secara in vitro.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1 Inisiasi Kalus Tanaman Sirih Hutan

Inisiasi tanaman sirih hutan terhadap media 2,4D 2 mg/L + Kinetin 2 mg/L dengan 4 komposisi gula, yaitu 30 g, 60 g, 90 g, dan 120 g/L menunjukkan hasil yang berbeda-beda. Pada perlakuan 2,4-D 2 mg/L + 2 kinetin mg/L dengan penambahan sukrosa 30 g kalus mengalami pertumbuhan yang lebih baik dari perlakuan lainnya, dikarenakan pada perlakuan tersebut kalus terus mengalami pertumbuhan hingga 12 MST (Tabel 1).

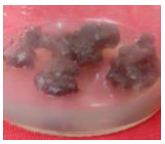
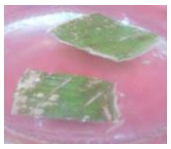
Tabel.1 Hasil pembentukan kalus tanaman sirih

Media	Sukrosa (g)	Awal muncul kalus (MST)	Warna kalus	Tekstur kalus
2,4-D 2 mg/l + Kinetin 2 mg/l	30	3-4	hijau	Remah kompak
	60	5-6	Coklat-hitam	Kompak
	90	7	Coklat-hitam	Kompak
	120	8	Coklat-hitam	Kompak

Maretzki (1974) dalam Irmawati (2007), menyatakan bahwa sukrosa yang terhidrolisis juga menyebabkan terjadinya peningkatan tekanan turgor. Tekanan turgor mampu menyebabkan pemanjangan dan perbesaran sel kalus peningkatan berat basah kalus, sebab respon setiap sel (tekanan turgor) terhadap cairan di sekitar sel berbeda-beda dan respon pertumbuhan sel terhadap penambahan karbohidrat juga berbeda-beda untuk setiap spesies.

Menurut Gandawijaya (1998) sukrosa merupakan salah satu komponen organik yang harus diberikan ke dalam media tumbuh disamping sebagai sumber karbon, juga berguna untuk mempertahankan tekanan osmotik media. Oleh karena itu, penambahan sukrosa yang relatif tinggi dalam media kultur untuk tanaman tertentu justru akan menghambat pertumbuhan sel-sel somatik. Hal ini akibat tekanan osmotik yang terlalu tinggi, sehingga lebih lanjut dapat mengakibatkan kematian sel-sel akibat terjadinya lisis atau pecahnya dinding sel .

Tabel 2. Inisiasi kalus pucuk sumber in vivo (a) dan perkembangan morfologi kalus usia 12 MST (b)

Media	Sukrosa (g)	Minggu ke-1	Minggu ke-12
2,4-D 2 mg/l + Kinetian 2mg/l	30		
	60		
	90		
	120		
		a	b

Sukrosa terbaik dalam menghasilkan kalus yang mengarah ke sifat embriogenik pada pemberian sukrosa 30 g tersebut terjadi pada minggu ke 3-4 setelah tanam (MST), pada penambahan sukrosa 60 g munculnya kalus terjadi pada minggu ke 5-6 setelah tanam (MST), penambahan sukrosa 90 g terjadi pada minggu ke 7 setelah tanam (MST), sedangkan pada penambahan sukrosa 120 g terjadi pada minggu ke 8 setelah tanam (MST). Hal ini sejalan dengan penelitian Barg dan Umiel (1977) dalam George dan Sherington (1984), konsentrasi sukrosa lebih tinggi menurunkan dan melambatkan pertumbuhan dan morphogenesis kalus .

3.2 Warna Kalus

Warna kalus yang terbentuk yaitu warna putih-hijau dan coklat-hitam. Pada perlakuan 2,4-D 2 mg/l + 2 kinetin mg/l dengan penambahan sukrosa 30 gram menghasilkan kalus warna hijau muda , sedangkan pada 3 perlakuan lainnya (penambahan sukrosa 60, 90, dan 120 g) menghasilkan kalus berwarna coklat-hitam. Menurut Andriyani (2010) Warna kalus digunakan sebagai salah satu indikator baik

© Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat, Universitas Lambung Mangkurat

p-ISSN 2623-1611
e-ISSN 2623-1980

tidaknya kualitas kalus. Kualitas kalus yang baik memiliki warna yang hijau, sedangkan warna yang terang atau putih diindikasikan perkembangan kalus cukup baik. Warna kalus yang berbeda menunjukkan respon kalus akibat pemberian sukrosa berbeda dari setiap perlakuan. Kalus dengan warna hijau menunjukkan adanya klorofil dalam kalus dan dapat berkembang menuju kalus yang embriogenik, sedangkan kalus berwarna hitam terjadi akibat adanya proses pencoklatan (browning) pada eksplan sebagai akumulasi dari senyawa fenol pada media atau sel dan fenol akan meracuni eksplan apabila tidak segera dilakukan subkultur. Variasi warna yang dihasilkan diduga disebabkan karena adanya perbedaan konsentrasi sukrosa pada masing-masing perlakuan, hal ini dikarenakan penimbunan sukrosa dalam sel. Menurut George dan Sherrington (1984), sukrosa dalam media kultur jaringan dapat menghambat sintesis klorofil dengan tingkat penghambatan yang berbeda-beda tergantung jaringan dan spesies tumbuhan. Penimbunan sukrosa dalam sel dapat menghambat proses fotosintesis.

3.3 Tekstur Kalus

Tekstur kalus yang terbentuk pada perlakuan menunjukkan hasil yang berbeda pada perlakuan 2,4-D 2 mg/L + 2 kinetin mg/L dengan penambahan sukrosa 30 gram membentuk tekstur kalus remah kompak, sedangkan pada 3 perlakuan lainnya (penambahan sukrosa 60, 90, dan 120 g) membentuk tekstur kalus kompak.

4. SIMPULAN

Kalus yang dihasilkan pada media dengan penambahan sukrosa 30 g berwarna putih kehijauan dengan tekstur kalus remah kompak muncul pada minggu ke 3-4, sedangkan kalus yang dihasilkan pada media dengan penambahan sukrosa 60, 90, dan 120 g berwarna coklat kehitaman dengan tekstur kalus kompak

5. UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Pemerintah Indonesia melalui Kemenristekdikti dan FMIPA Universitas Mulawarman. Terima kasih tak terhingga juga untuk rekan-rekan di Lab Kultur Jaringan Tanaman FMIPA Universitas Mulawarman atas peran sertanya dalam membantu penyediaan eksplan tanaman dan pengumpulan data di laboratorium.

6. DAFTAR PUSTAKA

Ascher KRS, Reynold H. 2002. *Natural Pesticides from Cinnamomum*. Eschbataun, Rottach-Egern, FRG.

Baldoqui DC, Kato MJ, Cavalheiro AJ, Bolzani VS, Young MCM, Furlan M. 1999. A chromene and prenylated benzoic acid from *Piper aduncum* . *Phytochemistry* 51: 899–902.

Bernard CB, Krishanmurty HG, Chauret D, Durst T. 1995. Insecticidal defenses of Piperaceae from the Neotropics. J. *Chem. Ecol*. 21: 801-814.

Castro SW, Martins JRS, Souza HEM, Heinzen H, Cesio MV, Mato M, Albrecht F, Azevedo JL, Barros NM. 2009. Toxicity of *Piper aduncum* L. (Piperales: Piperaceae) from the Amazon forest for the cattle tick Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology* 164: 267–274

Dhawan S, Shasany AK, Naqvi AA, Kumar S, Khanuja SPS. 2003. Menthol tolerant clones of *Mentha arvensis*: approach for *in vitro* selection of menthol rich genotypes. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 75: 87-94

Elfina Y, Ali M, Aryanti L. 2015. Uji beberapa konsentrasi ekstrak tepung daun sirih hutan (*Piper aduncum* L.) untuk mengendalikan penyakit antraknosa pada buah cabai merah pascapanen. *Sagu* 14(2): 18-27.

Gandawijaya D. 1998. Pengaruh sukrosa dan glutamine pada kultur anter *Solanum khasianum* Clarke. *J. Ilmiah Biologi* 4: 98—102.

George EP, Sherington PD. 1984. *Plant Propagation by Tissue Culture.*. (Hand book and Directory of Commercial Laboratories). Exigetic Limited, Eversley.

Gottlieb AM, Koketsu M, Magalhães MT, Maia JGS. 1981. Óleos Essenciais da Amazônia VII. *Acta Amazon.*11: 143-148.

Khanam N, Khoo C. Khan AG. 2000. Effects of cytokinin/auxin combinations on organogenesis, shoot regeneration and tropane alkaloid production in *Duboisia myoporoides*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 62: 125–133.

National Institute of Allergy and Infection Deseases. https://www.niaid.nih.gov/ diseases- conditions/ dengue-fever.*Diunduh Tgl 14 Juni 2017*.

Rao SM, Ravishankar GA. 2002. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolities. *Biotechnol. Adv*. 20: 101–153.

Sari YP, Kusuma R. 2015. Modifikasi konsentrasi sukrosa pada media padat dan cair untuk pertumbuhan kalus tanaman sarang semut (Mymecodia tuberosa Jack). *BioWallacea Jurnal Ilmiah Ilmu Biologi* 1(1): 9-13.

Shaalan EAS, Canyonb D, Younesc MWF, Abdel-Wahaba H, Mansoura AH. 2005. A review of botanical phytochemicals with mosquitocidal potential. *Environ Int*. 3:1149-66.

Sudrajat. 2010. Bioprospeksi tumbuhan sirih hutan (*Piper aduncum* L) sebagai bahan baku obat larvasida nyamuk *Aedes aegypti*. *Bioprospek* 7 (2),

© Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat, Universitas Lambung Mangkurat

p-ISSN 2623-1611
e-ISSN 2623-1980

September. http://fmipa.unmul.ac.id/pdf/81. Diakses 18 November 2012.

Sudrajat, Susanto D, Mintargo D. 2011. Bioekologi dan potensi senyawa bioaktif sirih hutan (*Piper aduncum* L.) sebagai sumber bahan baku larvasida nyamuk *Aedes aegypti* L. Program Studi Biologi FMIPA Universitas Mulawarman (http://fmipa.unmul.ac.id/pdf/44)

Terrier B, Courtois D, Henault N, Cuvier A, Bastin M, Aknin A, Dubreuil J, Petiard V. 2007. Two new disposable bioreaktors for plant cellculture: The wave and undertow bioreaktor and the slug bubble bioreaktor. *Biotechnology and Bioengineering* 96, (5): 914-923.

World Health Organization. 2009. Treatment, Prevention and Control. http://www.who.int/tdr/publications/documents/dengue-diagnosis.pdf. Diakses Juni 2017

World Health Organization. 2017. *Dengue and Severe Dengue.* Factsheet Updated April 2017 .http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/. Diakses: Juni 2017

Yusnita, 2003. *Kultur Jaringan Cara Memperbanyak Tanaman Secara Efisien*. Agromedia Pustaka, Bogor.

© Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat, Universitas Lambung Mangkurat