



LITERATUR REVIEW : TEKNIK STERILISASI KULTUR JARINGAN TANAMAN DALAM PRODUKSI FLAVONOID

Anisa Wulandari¹, Himalaya Wana Kelana², Syarif Hamdani³

^{1,2,3}Program Studi Sarjana Farmasi, Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia, Bandung
syarifhamdani@stfi.ac.id

Abstrak

Permintaan flavonoid sebagai metabolit sekunder penting di bidang farmasi, pangan, dan kosmetik terus meningkat sehingga diperlukan alternatif produksi yang stabil dan berkelanjutan melalui kultur jaringan tanaman. Keberhasilan teknik ini sangat bergantung pada protokol sterilisasi eksplan yang efektif namun tidak menimbulkan fitotoksitas. Artikel ini mereview berbagai teknik sterilisasi kultur jaringan pada beragam spesies dan jenis eksplan (biji, daun, nodus, akar, rimpang) serta menilai dampaknya terhadap viabilitas jaringan dan produksi flavonoid. Penelitian disusun dengan pendekatan *literature review* menggunakan kerangka PICOC. Data diperoleh dari ProQuest pada periode 2015–2025, diseleksi melalui kriteria inklusi–eksklusi, dan dianalisis secara sistematis sesuai alur PRISMA. Hasil menunjukkan bahwa protokol paling konsisten terdiri atas pra-pencucian dengan deterjen, perendaman etanol 70% singkat, dilanjutkan NaOCl aktif 1–2,5% selama 10–15 menit untuk jaringan sensitif atau larutan komersial NaOCl 15–30% ($\approx$ 1–5% aktif) selama 10–20 menit untuk jaringan lebih tahan, kemudian bilasan steril 3–5 kali. Pada eksplan dengan tingkat kontaminasi tinggi seperti rimpang, tambahan povidone iodine atau nanopartikel perak terbukti efektif menekan mikroba tanpa menurunkan viabilitas. Sementara itu, HgCl_2 0,1–0,2% masih digunakan dalam kasus sulit meskipun penggunaannya semakin terbatas karena risiko toksisitas. Secara keseluruhan, protokol berbasis NaOCl dengan konsentrasi terukur dan bilasan cukup merupakan pilihan paling aman, ekonomis, dan serbaguna untuk menghasilkan kultur bebas kontaminan sekaligus mempertahankan potensi biosintesis flavonoid.

Kata Kunci: *Flavonoid, Kultur Jaringan, Eksplan, Sterilisasi, Literature Review*

Abstract

The increasing demand for flavonoids as important secondary metabolites in the pharmaceutical, food, and cosmetic industries highlights the need for a stable and sustainable production alternative through plant tissue culture. The success of this technique depends largely on explant sterilization protocols that are effective yet non-phytotoxic. This article reviews various sterilization techniques applied to different plant species and explant types (seeds, leaves, nodes, roots, and rhizomes) and evaluates their impact on tissue viability and flavonoid production. The study was conducted as a literature review using the PICOC framework. Data were collected from ProQuest within the 2015–2025 period, screened based on inclusion and exclusion criteria, and systematically analyzed following the PRISMA flow. Findings indicate that the most consistent sterilization protocol involves prewashing with detergent, a brief 70% ethanol treatment, followed by NaOCl at 1–2.5% for 10–15 minutes for sensitive tissues or commercial NaOCl solution at 15–30% ($\approx$ 1–5% active) for 10–20 minutes for more resistant tissues, and concluded with 3–5 sterile rinses. In explants with high microbial loads such as rhizomes, the addition of povidone iodine or silver nanoparticles effectively reduced contamination without compromising viability. Meanwhile, HgCl_2 at 0.1–0.2% remains useful in difficult cases, although its application is increasingly limited due to toxicity risks. Overall, NaOCl-based protocols with carefully measured concentrations and adequate rinses represent the safest, most economical, and most versatile approach to achieving contaminant-free cultures while preserving the biosynthetic potential of flavonoids.

Keywords: *Flavonoids, Tissue Culture, Explants, Sterilization, Literature Review*

@Jurnal Ners Prodi Sarjana Keperawatan & Profesi Ners FIK UP 2025

* Corresponding author :

Address : Jl. Soekarno-Hatta No.354, Batununggal, Kec. Bandung Kidul, Kota Bandung, Jawa Barat 40266

Email : syarifhamdani@stfi.ac.id

PENDAHULUAN

Permintaan global terhadap senyawa bioaktif alami terus meningkat, dan juga kesadaran konsumen akan manfaat kesehatan dan keamanan produk yang menuntut adanya sumber produksi yang efisien dan berkelanjutan. Salah satu solusi adalah melalui kultur jaringan tanaman, yang menawarkan jalur produksi senyawa bioaktif yang lebih terukur, karena teknik ini memungkinkan optimalisasi produksi metabolit sekunder dengan memperbanyak sel atau jaringan dalam kondisi steril (aseptik), tanpa bergantung pada ketersediaan tanaman di alam (Anikina et al., 2025). Kultur jaringan tanaman adalah teknik *in vitro* (di dalam kaca/laboratorium) yang didasarkan pada prinsip totipotensi sel, yaitu kemampuan setiap sel tanaman untuk beregenerasi menjadi tanaman utuh jika ditempatkan dalam lingkungan yang sesuai (Mahadi et al., 2016).

Salah satu senyawa metabolit sekunder yang sudah diketahui memiliki manfaat yang besar adalah flavonoid. Flavonoid merupakan kelompok polifenol yang melimpah pada tanaman dan memainkan peran penting dalam ekologi tumbuhan, terutama sebagai senyawa pertahanan terhadap cekaman biotik (patogen) maupun abiotik (sinar UV dan kekeringan) (Li et al., 2025). Lebih dari itu, bagi manusia, flavonoid telah diakui secara luas karena spektrum aktivitas farmakologisnya. Dari penelitian sebelumnya juga diketahui manfaat dari flavonoid, antara lain sebagai antioksidan kuat, agen antiinflamasi, potensi antikanker, dan senyawa kardioprotektif. Kultur jaringan menjadi solusi terhadap meningkatnya permintaan flavonoid di sektor farmasi, pangan, dan kosmetik yang sedang berkembang (Roy et al., 2022).

Langkah paling krusial dalam keberhasilan kultur jaringan adalah sterilisasi pada eksplan, yaitu bagian tanaman yang akan digunakan untuk perbanyakan. Keberhasilan dalam kultur jaringan sangat dipengaruhi oleh proses sterilisasi eksplan (Anikina et al., 2025). Berbagai studi telah menguji kombinasi bahan kimia untuk sterilisasi, termasuk etanol, natrium hipoklorit (NaOCl), merkuri klorida (HgCl₂), hidrogen peroxide (H₂O₂), dan kalsium hipoklorit (Ca(OCl)₂). Setiap kombinasi punya kelebihan dan kekurangan, baik dari segi efektivitas menghilangkan kontaminan maupun dampaknya pada eksplan. Hubungan antara eksplan dan proses sterilisasi sangat erat, sebab setiap jenis jaringan memiliki tingkat kontaminasi mikroba permukaan dan sensitivitas

terhadap fitotoksisitas yang berbeda (Hesami, et al., 2019). Penyesuaian tersebut harus mempertimbangkan sifat fisiologis dan anatomi eksplan, serta perbedaan asal sumber bahan, agar mencapai kondisi ideal yang mampu menekan kontaminasi tanpa merusak integritas jaringan yang menjadi basis produksi flavonoid secara konsisten dan berkelanjutan (Hesami, et al., 2019). Secara umum, konsentrasi dan waktu paparan zat sterilan bervariasi antara satu eksplan dengan yang lain, tergantung pada morfologi eksplan tersebut, seperti kelembutan dan kekerasan jaringan (Zinabu et al., 2018).

Berdasarkan latar belakang tersebut, penelitian ini disusun sebagai tinjauan sistematis berbasis kerangka PICOC, yang akan memetakan dan mengevaluasi variasi protokol sterilisasi, pada berbagai spesies tanaman dan jenis eksplan. Analisis akan berfokus pada teknik sterilisasi terhadap eksplan kultur jaringan dan produksi flavonoid, seperti kadar total flavonoid. Melalui review literatur ini, diharapkan dapat memberikan informasi yang berguna bagi peneliti, praktisi pertanian, dan konservasionis dalam menentukan protokol sterilisasi yang optimal, sehingga dapat meningkatkan konsistensi dan efisiensi produksi flavonoid melalui kultur jaringan.

METODE

Artikel ini disusun sebagai literature review menggunakan kerangka PICOC (*Population, Intervention, Comparison, Outcome, Context*). Berdasarkan PICOC, identifikasi masalah yang dapat kita telusuri:

P1: Apa kombinasi sterilisasi yang paling umum dilakukan dalam kultur jaringan produksi flavonoid?

P2: Bagaimana efektivitas berbagai teknik sterilisasi dalam kultur jaringan tanaman terhadap produksi flavonoid?

P3: Bagaimana pola teknik sterilisasi berbagai jenis eksplan penghasil flavonoid?

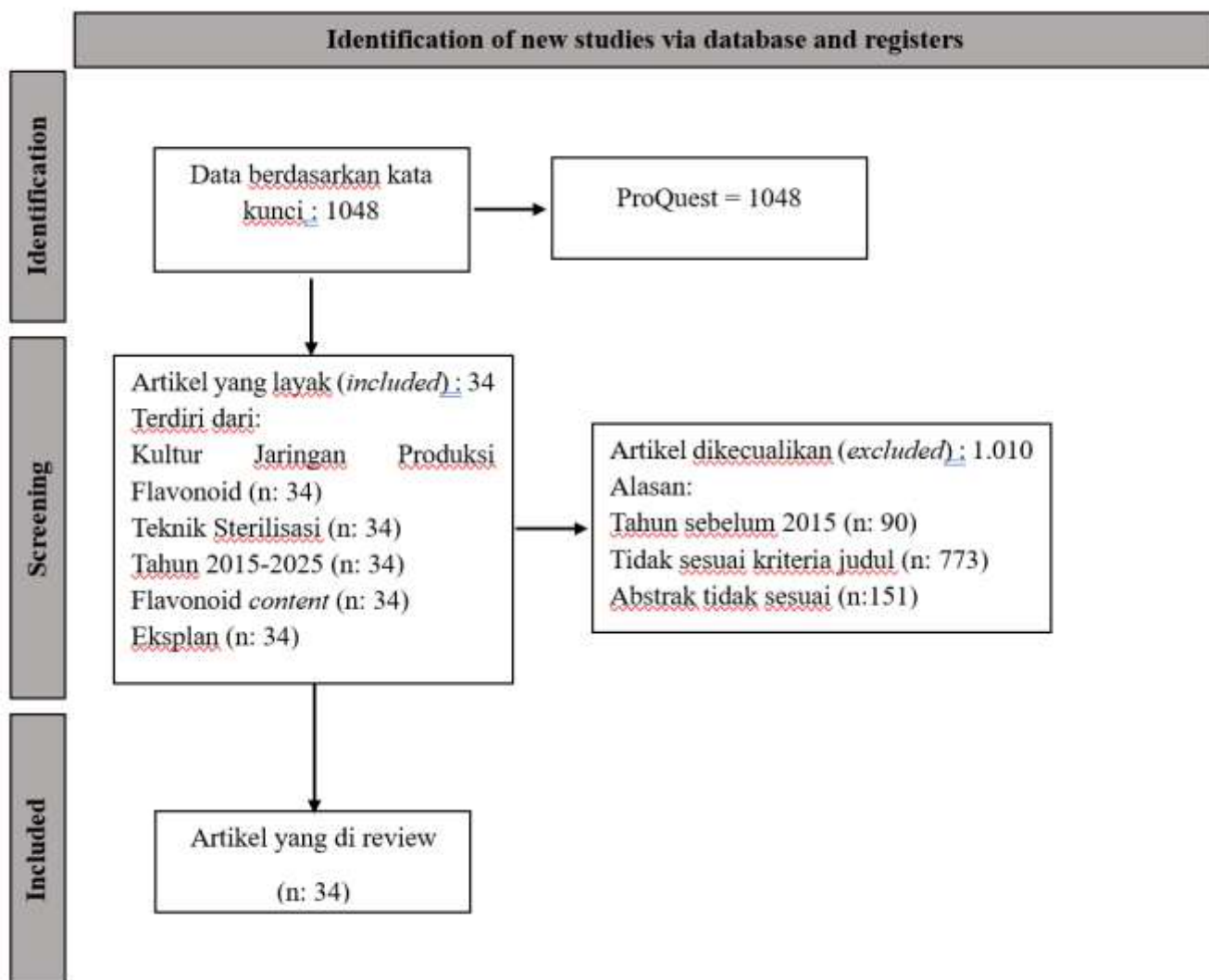
Penelusuran literatur dilakukan melalui database ProQuest pada periode 2015–2025 dengan kata kunci “sterilisasi eksplan”, “kultur jaringan tanaman”, dan “flavonoid”. Kriteria inklusi meliputi artikel original berbahasa Inggris yang membahas teknik sterilisasi eksplan dalam kultur jaringan terkait produksi flavonoid. Artikel berupa review, tidak tersedia full-text, atau di luar rentang tahun ditetapkan sebagai eksklusi. Seleksi literatur dilakukan secara sistematis mengikuti alur PRISMA, mulai dari identifikasi awal artikel,

penyaringan duplikasi, penilaian kelayakan, hingga pemilihan artikel akhir untuk dianalisis. Data yang diekstraksi mencakup jenis tanaman, jenis eksplan, protokol perlakuan, system kultur, serta produksi flavonoid.

Kriteria	Kajian
<i>Population (P)</i>	Spesies tanaman
<i>Intervention (I)</i>	Teknik sterilisasi
<i>Comparison (C)</i>	Jenis eksplan
<i>Outcomes (O)</i>	Flavonoid
<i>Context (C)</i>	Metoda kultur

Tab
el 1.
PIC
OC

HASIL DAN PEMBAHASAN



Gambar 1 Diagram PRISMA

Tabel 2 Hasil Pencarian Literature

Spesies Tanaman (P)	Teknik Sterilisasi (I)	Jenis Eksplan (C)	Outcome (O)	Metoda Kultur (C)	Rf
Eksplan Biji					
<i>Thymus daenensis</i> Celak	Natrium hipoklorit (NaOCl) 2.5% v/v selama 10 menit, bilasan air deionisasi steril dua kali	Biji	Tidak diprofilkan per senyawa; hanya total flavonoid (TFC) : 62.5 µg/ml	Kultur biji	(Samadi et al., 2023)
<i>Lycium schweinfurthii</i>	Biji dicuci etanol 70% selama 30 detik, kemudian Clorox 30% (NaOCl komersial) selama 10 menit, bilas 4 kali air suling steril.	Biji	Tidak diprofilkan per senyawa; hanya total flavonoid (TFC): 12.99 mg CE/g DW	kultur biji	(Mamdouh et al., 2021)
<i>Scutellaria brevibractea</i> subsp. <i>subvelutina</i>	Sterilisasi permukaan biji dengan HgCl ₂ 0.1% selama 5–20 menit	Biji	Jenis flavonoid (HPLC, mg/100 g DW): Baicalein (10–15), baicalin (66–105), wogonin (32–42), wogonoside (195–346), scutellarin (31–41), chrysin (32–39); total flavonoid 384.6–574.8 mg/100 g DW.	Kultur kalus berdiferensiasi tunas	(Łukaszyk et al., 2023)
<i>Citrus sinensis</i> (sweet orange), <i>Citrus reticulata</i> (mandarin), <i>Citrus maxima</i> (pummelo)	Teepol (deterjen) cuci awal; fungisida Carbendazim 1%; antibakteri HgCl ₂ 0.1% di bawah LAF; tiga kali bilas air steril; durasi langkah tidak semua dirinci per tahap.	Biji	Tidak diprofilkan per senyawa, TFC kalus Pummelo: 2.60 ± 0.06 mg rutin/g DW.; Sweet orange: 4.92 ± 0.02 mg rutin/g DW.; Mandarin: 5.55 ± 0.05 mg rutin/g DW.	Induksi kalus	(Manchanda et al., 2023)
<i>Ditrichia viscosa</i>	Biji disterilkan etanol 70% 1 menit lalu NaOCl 30% 15 menit dengan Tween 20; bilas 5× air germinasi	Biji	TFC tertinggi pada DvHrT1 (+164% vs wt)	Hairy root	(Paradiso et al., 2024)
<i>Fagopyrum tataricum</i> Gaertn.	Biji didehul dan disterilisasi 70% etanol 1 menit lalu 0,1% HgCl ₂ 10 menit, bilas air steril 4×	Biji	Quercetin 0,04 mg/g DW; 29,79 mg/g DW rutin.	Hairy root	(Huang et al., 2016)
<i>Cerantoniasiliqua</i> L.	Etanol 70% v/v 1 menit; Clorox 20% 15 menit yang setara 5,4% NaOCl nominal; bilas 5×.	biji	Jenis flavonoid (HPLC): Kaempferol, quercetin, myricetin, luteolin, apigenin, catechin, naringin, 7-OH flavone; TFC meningkat 34,4% pada 50 mg/L dibanding kontrol	Kultur biji	(Elsherif et al., 2025)
<i>Dendrobium amoenum</i> Wall. ex Lindl.	Cuci biji dengan Tween-20, NaOCl 1% 15 menit, etanol 70% 3–5 menit, bilas air steril; penaburan biji ke medium MS (padat/cair) dengan BAP dan 10% air kelapa.	Biji	TFC: 101,88 µg QE/mg	Kultur biji	(Paudel et al., 2025)
<i>Lotus arabicus</i> L.	Biji direndam etanol 70% 1 menit; Clorox 50% (mengandung 5,4% NaOCl) 20 menit; bilas air suling steril 5×; germinasi pada ½ MS gelap.	Biji	TFC dilaporkan sebagai setara quercetin; nilai peningkatan TFC pada 8 g/L adalah +24% vs kontrol	Kultur biji	(Elsherif et al., 2024)

<i>Ginkgo biloba</i> L.	Biji diimpregnasi etanol 96% lalu dikeringkan, diseterilkan 70% etanol 1 menit, kemudian larutan sulema 0.1% (HgCl ₂) 7 menit, dibilas 3× masing-masing 20 menit air steril.	Biji	Jenis flavonoid: Quercetin, isorhamnetin, luteolin, kaempferol, amentoflavone; juga terdeteksi ginkgetin (biflavonoid).	Kultur kalus	(Le et al., 2023)
<i>Sophora flavescens</i> Aiton	Benih disterilisasi NaOCl 10% (v/v) selama 15 menit; semua langkah aseptik di LAF	Biji	Jenis flavonoid: Isoflavonoid maackiain (Maac) utama; juga kurarinone (Kurari), methoxy-kurarinone (Kurari-OCH ₃), kushenol F (Kush F), kushenol E (Kush E).	Kultur biji	(J. S. Park et al., 2020)
Eksplan Daun					
<i>Calendula officinalis</i> L.	Detergen Teepol 25% 12 menit; air mengalir; kemudian di laminar flow ethanol 70% (v/v) 2 menit; HgCl ₂ 0.1% (w/v) 2 menit; bilas 3× dengan air suling autoklaf.	Daun muda	TFC: Kalus: 8.25 ± 0.2 mg QE/g DW (terendah). Daun lapang: 15.55 ± 0.3 mg QE/g DW. Daun in vitro: 16.04 ± 0.2 mg QE/g DW (tertinggi).	Kalus daun	(Fatima et al., 2024)
<i>Catalpa bungei</i> C. A. Mey	Pra-cuci deterjen 5 menit; bilas air kran 30–40 menit; etanol 75% selama 15 s atau 30 s; HgCl ₂ 0.1% selama 2/4/6/8 menit; bilas steril 4–5×.	Daun muda	TFC: DKW + 0.5 mg/L NAA + 0.5 mg/L 6-BA (G) 108.71 mg/g (tertinggi antar kombinasi L9); Elisitasi (media J: DKW + 2.0 6-BA + 1.0 NAA): YE 100 mg/L 168.652 mg/g (naik 41.7% vs kontrol 119.064 mg/g); Elisitasi (media K: DKW + 2.0 6-BA + 0.5 NAA): YE 100 mg/L 161.392 mg/g (naik 59.2% vs kontrol 101.376 mg/g).	Kalus daun	(Zeng et al., 2023)
<i>Salacia chinensis</i> L.	Daun dicuci air mengalir, larutan labogent 0,5% 5 menit, HgCl ₂ 0,1% 3 menit, bilas air steril 3×, kemudian diinokulasikan ke MS + 2,4-D + BAP.	daun muda	Tidak diprofilkan per senyawa ;TFC: 20,18 ± 0,91 mg QE/g DW;	Kultur kalus	(Chavan et al., 2021)
<i>Cotyledon orbiculata</i> L.	Detergen ringan + air mengalir 30 menit; etanol 70% selama 90 detik; HgCl ₂ 0.1% selama 15 menit; bilas air suling steril 3× (60 detik tiap bilasan).	Daun	Early SoE: TFC 0.97 ± 0.10 mg RE/g ekstrak; TPC 21.28 ± 0.05 mg GAE/g ekstrak. Mature SoE: TFC 0.95 ± 0.04 mg RE/g; TPC 21.32 ± 0.20 mg GAE/g. Germinated SoE: TFC 1.45 ± 0.04 mg RE/g; TPC 32.90 ± 0.46 mg GAE/g (tertinggi).	Somatic embryogenesis	(Zengin et al., 2023)
<i>Piper betle</i> L. var. <i>nigra</i>	Sabun/deterjen; etanol 70% selama 3 menit; Clorox 20% selama 5 menit; bilas air steril 3×.	Daun muda	Hanya uji kualitatif skrining fitokimia (uji Mg–HCl); positif flavonoid pada perlakuan 2,4-D 1,5 mg/L	Kultur kalus	(Junairiah et al., 2019)
<i>Catharanthus roseus</i> L.	Deterjen; etanol 70%; NaOCl komersial (Bayclin) 20% + Tween-20 (2 tetes) 10 menit; diikuti Bayclin 15% 7 menit; bilasan akuades steril 3×;	Daun	Tidak diprofilkan per senyawa ; TFC: 6 ppm Cu ²⁺ : 3.615 mg QE/g DW (tertinggi)	Kultur kalus	(Syam, et al., 2024)

	seluruhnya dalam laminar air flow.				
<i>Caesalpinia pulcherrima</i>	Cuci air mengalir 20 menit; Tween-20 2% 10–15 menit; fungisida Bavistin 1% 30 menit; etanol 70% 3–5 menit; HgCl ₂ 0,1% 1 menit; bilas air suling deionisasi tiga kali.	Pucuk, daun muda	Jenis flavonoid: Kuersetin dan glikosidanya; nilai kuersetin maksimum 16,5 mg/g DW	Kalus daun/pucuk, kultur suspensi sel	(Madanaku mar et al., 2017)
<i>Dysosma versipellis</i>	Etanol 75% selama 30 detik; HgCl ₂ 0,1% selama 8 menit; bilas air suling steril 3×; pra-cuci air mengalir.	Daun muda	kuersetin 2,116 mg/g DW pada leaf callus; kaempferol 2,858 mg/g DW; podofilotoksin 0,419 mg/g DW.	Kultur kalus	(Karuppaia & Wu, 2022)
<i>Melia azedarach</i> L.	Pretreat benomyl 2–3 g/L 2 jam; H ₂ O ₂ 5% atau 7% 10–15 menit; etanol 70% 20 detik; NaOCl 2% 12 menit dengan/ tanpa penyesuaian pH (7 atau 10) dan Tween-20 dua tetes; bilas 3× air steril.	Daun muda	Jenis flavonoid: Rutin (glikosida kuersetin), kuersetin, kaempferol ; TFC tertinggi 193,051 mg QE/g FW	Kultur kalus	(Ahmadpo or et al., 2022)
<i>Talinum paniculatum</i>	Cuci pendahuluan dengan deterjen cair + tiga tetes Tween-80, bilas air mengalir; dalam laminar, etanol 70% selama 3 menit; bilas akuades steril tiga kali.	Daun muda	Tidak ada identifikasi spesifik senyawa ; Puncak pada hari ke-28: 49.100 mg QE/g DW.	Kultur kalus	(Restiani, et al., 2024)
<i>Eryngium alpinum</i> L.	pra-perlakuan etanol 70% dilanjutkan natrium hipoklorit 2.5% dengan beberapa tetes Tween-80, diakhiri bilasan air suling steril autoklaf.	daun	TFC (mg/100 g DW): Tunas in vitro (padat): 146.98 ± 5.13 (tertinggi di padat). Tunas cair tergoyang: 144.53 ± 4.22. Tunas cair stasioner: 104.27 ± 10.49. Tunas dari kalus: 100.03 ± 5.22. Daun basal tanaman utuh (pembanding): 33.16 ± 2.16.	Kultur tunas	(Kikowska et al., 2020)
Eksplan Nodus/Ruas/Batang					
<i>Ceratoniasiliqua</i> L.	0.1% merkuri klorida (HgCl ₂) selama 10 menit	Segmen nodal	Jenis flavonoid (HPLC, µg/mL): Rutin, apigenin-7-glukosida, mirisetin, kuersetin, apigenin, kaempferol, chrysin; TFC: 27.33 µg/mL	Kultur tunas	(Sayed et al., 2020)
<i>Mentha viridis</i>	Pencucian air mengalir 30 menit dengan 4 tetes sabun cair; desinfeksi dengan 25% larutan Clorox (6% NaOCl) selama 6 menit; bilas tiga kali dengan air suling steril masing-masing 5 menit.	Ruas batang	Tidak ditetapkan spesifik per senyawa dengan HPLC; pelaporan sebagai flavonoid total; metabolit volatil utama minyak atsiri diidentifikasi (carvone, cis/trans-carveol, 1,8-cineole, d-limonene.).	Mikropropagasi	(El-Banna et al., 2024)
<i>Bougainvillea glabra</i> Choisy	Pra-cuci air mengalir + beberapa tetes deterjen 30 menit. Pretreatment antibiotik/fungisida: streptomisin 500 mg/250 mL + bavistin 500 mg/250 mL, 1	Ruas nodal	TFC: Node rerata 18.36 ± 4.67. Kalus terang: rerata 6.75 ± 1.07. Kalus gelap rerata 4.67 ± 0.72.	Induksi kalus	(Nasrat, et al., 2022)

	jam. Etanol 70% selama 25 detik; bilas 2× air steril. NaOCl komersial Clorox 30% (berbasis 5.25% NaOCl) + tween-20, 15 menit pada shaker 300 rpm; bilas 3× air steril.				
<i>Ruta chalepensis</i> L.	Cuci air keran 15 menit; deterjen cair 5% (v/v) 6 menit; bilas 3–5×; laminar flow: HgCl ₂ 0.1% selama 3 menit; bilas 4–5×; pemotongan eksplan sebelum inokulasi.	Segmen internodu s muda	Jenis flavonoid (spesifik): Rutin dan hesperidin; TFC: 86.31±0.61	Kultur kalus	(Qahtan et al., 2022)
<i>Dysosma versipellis</i>	Etanol 75% selama 30 detik; HgCl ₂ 0,1% selama 8 menit; bilas air suling steril 3×; pra-cuci air mengalir.	Daun muda, petiol, batang	kuersetin 2,116 mg/g DW pada leaf callus; kaempferol 2,858 mg/g DW; podofilotoksin 0,419 mg/g DW.	Kultur kalus	(Karuppaia a & Wu, 2022)
<i>Glycyrrhiza glabra</i> L.	Teepol 30% selama 8–10 menit; bilas air mengalir; etanol 70% dan HgCl ₂ 0.1% selama 2–3 menit; bilas air suling autoklaf.	Eksplan Akar Akar	TFC: Kalus akar: 0.72 ± 0.36 mg QE/g DW (terendah). Akar in vivo: 1.44 ± 0.15 mg QE/g DW. Akar in vitro: 1.58 ± 0.67 mg QE/g DW (tertinggi).	Kalus akar	(Bansal et al., 2024)
<i>Cichorium intybus</i> L.	Biji dicuci deterjen+air, etanol 70% 30 detik, NaOCl 1% + Tween-20 selama 20 menit, bilas air suling steril, tanam pada MS; kultur kalus dilakukan aseptik.	Segmen akar	TFC: Kontrol: 4.79 ± 0.23 mg QE/g DW. YE 1–4 g/L: 5.47–5.82 mg QE/g DW (naik 1.14–1.22× kontrol). A. niger 1 g/L: 6.62 ± 0.21 mg QE/g DW (tertinggi; 1.38× kontrol). F. oxysporum 1 g/L: 5.61 ± 0.10 mg QE/g DW.	Kalus akar	(Elateeq et al., 2025)
<i>Stevia rebaudiana</i>	Sterilisasi benih dengan etanol 70% dan HgCl ₂ 0,2%, diikuti bilas air destilasi steril berkali- kali sebelum semai pada MS steri	Segmen akar	TFC naik hingga 0,22 mg QE/g DW pada 100 mg/L vs kontrol 0,11 mg QE/g DW	Kultur akar adventif	(Ahmad et al., 2022)
<i>Zingiber officinale</i> var. <i>rubrum</i>	Pencucian air mengalir ±5 menit; perendaman deterjen 15 menit. Etanol 70% selama 2 menit; bilas akuades dengan deterjen 20 dan 30 menit. Larutan steril: akuades steril + NaOCl 5,25% + povidone iodine 10% selama 1 jam; dibilas tiga kali dengan akuades steril (5, 3, 1 menit) di LAF.	Eksplan Rimpang Tunas rimpang	Tidak ada identifikasi spesifik senyawa ; TFC: 0.29 ± 0.18 µg/mL QE	Kultur kalus	(Widyastut i et al., 2024)
<i>Kaempferia larsenii</i> Sirirugsa	Semprot etanol 70% v/v selama 30 detik; natrium hipoklorit (NaOCl) 20% selama 20 menit dan/atau 15% selama 15 menit; bilas air	Tunas Rimpang	Jenis flavonoid terdeteksi (HPLC): Rutin, quercetin, myricetin, apigenin; TFC (daun induk 47,89; in vitro MS 6,28; in vitro + PGR	Kultur tunas	(Saensouk et al., 2025)

	suling steril 3x, masing-masing 5 menit.		11,47).		
<i>Curcuma larsenii</i> Maknoi & Jenjitikul	Pra-cuci air mengalir 1 jam; etanol 70% v/v 1 menit; NaOCl 20% selama 20 menit diikuti 15% selama 15 menit; bilas 3× air suling steril masing-masing 5 menit.	Tunas aksiler	TFC: Daun in vitro MS: 28.19 mg RE/g DW; daun in vitro MS + 2 mg/L BA + 0.1 mg/L NAA: 26.04 mg RE/g DW. Akar in vitro MS: 20.45 mg RE/g DW; akar in vitro MS + PGR: 15.22 mg RE/g DW; Jenis flavonoid: apigenin, rutin, galangin, chrysin, pinostrobin, 5,7-dimetoksiflavin, trimetoksiflavin, tetrametoksiflavin, dan ayanin ; jaringan daun in vitro TFC 1,55 ± 0,07 mg RE/g	Mikropro pagasi organ	(Saensouk et al., 2024)
<i>Kaempferia parviflora</i>	Sterilisasi awal NaOCl 2,5% 12 menit; dekontaminasi tambahan dengan AgO NPs 0–200 mg/L selama 30–90 menit; bilas steril 6×; NaOCl saja tidak cukup sehingga digunakan AgO NPs.	Tunas rimpang			(H. Y. Park et al., 2021)

Pembahasan

Kultur jaringan merupakan metode perbanyakan sekaligus rekayasa tanaman yang dilakukan secara in vitro dengan memanfaatkan sifat totipotensi pada media dengan komposisi nutrisi yang tepat, dalam kondisi aseptik dan lingkungan terkontrol (Fehér, 2019). Melalui teknik ini, bagian tanaman dapat diinduksi untuk membentuk kalus, organ seperti akar atau tunas, embrio somatik, maupun sistem kultur tertentu yang dirancang untuk menghasilkan biomassa dan metabolit sekunder, termasuk flavonoid (Zeng et al., 2023).

Sterilisasi merupakan tahap kunci yang menentukan keberhasilan seluruh rangkaian kultur jaringan tumbuhan, karena kualitas eksplan yang benar-benar aseptik menjadi prasyarat bagi inisiasi, induksi kalus, diferensiasi organ, hingga stabilitas produksi metabolit sekunder di tahap lanjutan (Ahmadpoor et al., 2022). Tanpa protokol sterilisasi yang tepat, akan membuka peluang terjadinya kontaminasi mikroba, baik oleh jamur maupun bakteri, yang tidak hanya meningkatkan angka mortalitas eksplan, melainkan juga menginduksi browning akibat oksidasi fenolik, yang selanjutnya berdampak pada menurunnya viabilitas jaringan serta hilangnya kompetensi morfogenetik yang dibutuhkan secara konsisten di kondisi in vitro, untuk mendukung biosintesis metabolit sekunder termasuk flavonoid (Amente & Chimdessa, 2021).

Hubungan antara eksplan dan proses sterilisasi sangat erat, sebab setiap jenis jaringan memiliki tingkat kontaminasi mikroba permukaan dan sensitivitas terhadap fitotoksitas yang

berbeda (Permadi et al., 2025). Dalam sistem kultur lanjutan, seperti suspensi sel maupun hairy root, sterilisasi permukaan eksplan hanya merupakan langkah awal, karena kontrol kontaminasi tetap harus dijaga melalui penerapan aseptik ketat, sterilisasi media dan peralatan, serta pengelolaan bakteri pada fase kultur, khususnya pada hairy root (Awere et al., 2024).

Pemahaman mengenai keterkaitan antara tipe kultur, karakter eksplan, dan kebutuhan sterilisasi, menuntut adanya penyesuaian protokol sterilisasi, agar tercapai keseimbangan yang tepat antara efektivitas dekontaminasi dan kelestarian jaringan hidup. Penyesuaian tersebut harus mempertimbangkan sifat fisiologis dan anatomi eksplan, serta perbedaan asal sumber bahan, agar mencapai kondisi ideal yang mampu menekan kontaminasi tanpa merusak integritas jaringan yang menjadi basis produksi flavonoid secara konsisten dan berkelanjutan (Permadi et al., 2025).

Review ini menghimpun 34 studi lintas spesies dan sistem kultur yang mengevaluasi protokol sterilisasi yang diaplikasikan pada beberapa jenis eksplan penghasil flavonoid, mencakup biji, daun, ruas nodal, batang, akar, rimpang, hingga jaringan in vitro yang kemudian diinduksi menjadi kalus, tunas, akar adventif, suspensi sel, atau hairy root.

Pola sterilisasi eksplan berupa biji umumnya mengikuti tahapan sistematis yang diawali dengan pra-pencucian menggunakan larutan deterjen (misalnya Teepol) untuk menurunkan beban kontaminan permukaan. Tahap berikutnya adalah perendaman cepat dengan etanol 70% selama 30–60 detik yang berfungsi sebagai

desinfeksi awal sekaligus meningkatkan penetrasi oksidator. Sterilisasi ini umumnya menggunakan larutan natrium hipoklorit (NaOCl) komersial 20–30% (setara ± 1 –5% bahan aktif) selama 10–15 menit atau merkuri(II) klorida (HgCl_2) 0,1% selama 5–10 menit, kemudian diikuti bilasan berulang dengan akuades steril sebanyak 3–5 kali untuk menghilangkan residu kimia (Putri et al., 2024). Pendekatan bertingkat ini terbukti efektif menekan pertumbuhan bakteri maupun jamur sekaligus mempertahankan viabilitas embrio, sehingga kultur biji tetap memiliki kapasitas biosintesis flavonoid. Dibandingkan eksplan vegetatif, biji cenderung lebih toleran terhadap paparan oksidator, diduga karena perlindungan integumen serta struktur embrio yang lebih resisten terhadap kerusakan oksidatif (Permadi et al., 2025).

Berbeda dengan biji, daun atau herba muda merupakan tipe eksplan yang paling sensitif terhadap bahan sterilan sehingga lebih berisiko mengalami fitotoksisitas (Asmono et al., 2022). Protokolnya biasanya dimulai dengan pencucian deterjen di bawah aliran air, perendaman singkat dalam etanol 70% selama 1–2 menit, lalu perlakuan oksidator berupa HgCl_2 0,1% selama 2–3 menit atau NaOCl 1–2% aktif selama 10–15 menit, dan diakhiri bilasan steril. Karena daun muda sering mengalami browning akibat oksidasi fenolik, bagian jaringan yang nekrosis kerap dipangkas setelah sterilisasi (Amente & Chimdessa, 2021). Sejalan dengan meningkatnya kesadaran terhadap toksisitas merkuri, penggunaan HgCl_2 kini semakin diminimalkan dan diganti dengan optimasi NaOCl yang dikombinasikan surfaktan, H_2O_2 , atau pretreatment fungisida/antibiotik (Anikina et al., 2025).

Eksplan ruas atau nodus memiliki sensitivitas menengah, tidak setoleran biji namun lebih kuat dibanding daun muda (Hesami et al., 2019). Protokol umumnya terdiri atas perendaman singkat etanol 70% selama 15–60 detik, dilanjutkan NaOCl komersial 15–30% (≈ 1 –3% aktif) selama 6–15 menit, atau alternatif HgCl_2 0,1% selama 2–8 menit, diikuti bilasan steril. Tantangan utama ruas/nodus adalah tingginya risiko kontaminasi endofitik serta luka pemotongan (Permadi et al., 2025). Upaya tambahan berupa pra-perendaman fungisida atau antibiotik dan penggunaan surfaktan (misalnya Tween) terbukti meningkatkan penetrasi oksidator sehingga memungkinkan konsentrasi lebih rendah tanpa mengorbankan efektivitas dekontaminasi

(Ahmadpoor et al., 2022; Rahayu & Mardini, 2015).

Eksplan akar menuntut perhatian khusus karena sangat rentan mengalami browning dan nekrosis akibat kandungan enzim oksidatif dan fenolik terlarut (Liu et al., 2024). Pola sterilisasi biasanya mencakup pencucian awal deterjen, perendaman etanol 70%, lalu perlakuan HgCl_2 0,1% singkat atau kombinasi etanol dengan NaOCl 1% selama sekitar 20 menit, diakhiri dengan bilasan steril 3–5 kali. Karena jaringan akar sangat sensitif, durasi perlakuan HgCl_2 dipersingkat, sedangkan efektivitas NaOCl ditingkatkan dengan penambahan surfaktan. Pendekatan ini penting agar keseimbangan antara kondisi steril dan viabel tetap terjaga, sehingga organogenesis dan jalur fenilpropanoid yang berperan dalam biosintesis flavonoid tidak terganggu (Anikina et al., 2025; Dias et al., 2021).

Eksplan rimpang dan tunas rimpang merupakan organ dengan tingkat kontaminasi tertinggi, terutama pada famili Zingiberaceae yang kaya mikroba endofitik (Widyastuti et al., 2024). Sterilisasi rimpang memerlukan strategi lebih kompleks, dengan oksidator lebih kuat, durasi lebih lama, serta langkah tambahan. NaOCl tetap menjadi pilihan utama, misalnya pada *Kaempferia* dan *Curcuma* perendaman larutan NaOCl komersial 20% selama 15–20 menit dilaporkan efektif, meskipun memerlukan bilasan intensif untuk menghindari akumulasi residu klorin yang bersifat fitotoksik (Wang et al., 2024). Selain pola standar berupa pra-cuci, etanol singkat, oksidator utama, dan bilasan multipel, pendekatan tambahan sering digunakan. Povidone iodine terbukti menekan pertumbuhan mikroba tanpa fitotoksisitas tinggi (Khaerasani et al., 2017), sedangkan penggunaan nanopartikel perak oksida (AgO NPs) pada *Kaempferia parviflora* menawarkan alternatif ramah lingkungan dan selektif dibanding HgCl_2 (Han-Yong et al., 2021).

Secara keseluruhan, setiap jenis eksplan memiliki kebutuhan berbeda dalam pemilihan sterilan. Biji relatif lebih toleran terhadap oksidator, daun muda memerlukan perlakuan lembut, nodus menghadapi risiko endofit tinggi, akar sangat sensitif terhadap kerusakan oksidatif, sedangkan rimpang menuntut strategi kombinasi intensif. Penyesuaian protokol ini merupakan kunci keberhasilan untuk mendapatkan kultur aseptik yang tetap viabel dalam memproduksi flavonoid.

Sodium hipoklorit (NaOCl) menjadi agen sterilan yang paling luas digunakan, tercatat pada

lebih dari separuh studi. Konsentrasi 1–2,5% selama 10–15 menit efektif untuk eksplan sensitif seperti daun muda atau akar, sedangkan larutan komersial seperti Clorox 15–30% (± 5 –6% klor aktif) dipakai untuk jaringan yang lebih resisten, dengan 3–5 kali bilasan untuk menekan residu klorin. Etanol 70% hampir selalu diposisikan sebagai langkah awal singkat 30–90 detik (kadang 2–3 menit untuk bahan kotor) untuk merusak membran mikroba dan meningkatkan pembasahan, sehingga etanol digunakan sebagai bilasan awal sebelum NaOCl atau alternatif lain, namun durasi berlebih dapat meningkatkan risiko nekrosis jaringan halus (Amente and Chimdessa, 2021). HgCl₂ 0,1% juga dilaporkan menghasilkan tingkat sterilisasi tinggi, misalnya pada *Ceratonia*, *Scutellaria*, dan *Calendula*, terutama untuk bahan sangat terkontaminasi atau berkayu (Anikina *et al.*, 2025)a. Namun, pemakaiannya kini semakin terbatas karena bersifat toksik dan menimbulkan permasalahan limbah. Jika tetap digunakan, durasi dipersingkat dan bilasan diperbanyak untuk menjaga viabilitas. Penambahan agen lain seperti H₂O₂ (5–7%) pada *Melia azedarach* L, kadang dipakai sebagai alternatif. Sedangkan povidone

iodine digunakan pada sebagian kasus untuk dekontaminasi tambahan. Dan penggunaan kombinasi fungisida atau antibiotik, seperti benomyl/bavistin dan streptomisin, sering diterapkan sebagai perlakuan awal (*pretreatment*) pada eksplan yang berasal dari lapangan dengan tingkat kontaminasi mikroba yang tinggi (Barvaliya *et al.*, 2023).

Keunggulan utama dalam studi ini terletak pada kombinasi bertahap yang memberikan hasil lebih konsisten dibanding *single-step*, seperti etanol 70% singkat diikuti NaOCl 1–2,5% 10–15 menit dan bilasan 3–5 kali pada banyak spesies, yang menekan kontaminasi tanpa memangkas viabilitas secara signifikan. Beberapa studi juga menambahkan *pre-treatment* seperti pencucian air mengalir, deterjen/Teepol, fungisida (benomyl/bavistin), atau antibiotik (streptomisin) efektif untuk eksplan lapang dan jaringan yang cenderung membawa epifit/endofit tinggi (*Bougainvillea*, *Caesalpinia*, *Citrus*, *Cichorium*). Kombinasi ini relevan terutama untuk kultur lanjutan seperti *hairy root*, di mana eliminasi *Agrobacterium* memerlukan tambahan antibiotik pada subkultur awal (Awere *et al.*, 2024).

Tabel 3 Hasil Produksi Flavonoid Antara Tumbuhan Induk dan Hasil Kultur.

Spesies Tanaman	Jenis Eksplan	Teknik Sterilisasi	Flavonoid Tumbuhan Induk (In Vivo)	Flavonoid Hasil Kultur (In Vitro)	Rf
<i>Kaempferia larsenii</i> Sirirugsa	Tunas Rimpang	Semprot etanol 70% v/v selama 30 detik; natrium hipoklorit (NaOCl) 20% selama 20 menit dan/atau 15% selama 15 menit; bilas air suling steril 3x, masing-masing 5 menit.	Nilai TFC daun induk 47,89 mg QE/g DW	Nilai TFC daun in vitro pada media MS 6,28 mg QE/g DW dan in vitro + PGR 11,47 mg QE/g DW	(Saensouk <i>et al.</i> , 2025)
<i>Citrus sinensis</i> (sweet orange), <i>Citrus reticulata</i> (mandarin), <i>Citrus maxima</i> (pummelo)	Biji	Teepol (deterjen) cuci awal; fungisida Carbendazim 1%; antibakteri HgCl ₂ 0.1% di bawah LAF; tiga kali bilas air steril; durasi langkah tidak semua dirinci per tahap.	Nilai TFC: Pummelo: 3.25 $\pm$ 0.03 mg rutin/g DW. Sweet orange: 5.94 $\pm$ 0.07 mg rutin/g DW. Mandarin: 6.56 $\pm$ 0.05 mg rutin/g DW.	Nilai TFC : Pummelo: 2.60 $\pm$ 0.06 mg rutin/g DW. Sweet orange: 4.92 $\pm$ 0.02 mg rutin/g DW. Mandarin: 5.55 $\pm$ 0.05 mg rutin/g DW.	(Manchanda <i>et al.</i> , 2023)
<i>Glycyrrhiza glabra</i> L. (licorice)	Akar	Teepol 30% selama 8–10 menit; bilas air mengalir; etanol 70% dan HgCl ₂ 0.1% selama 2–3 menit; bilas air suling autoklaf.	Nilai TFC : 1.44 $\pm$ 0.15 mg QE/g DW	Nilai TFC: 1.58 $\pm$ 0.67 mg QE/g DW	(Bansal <i>et al.</i> , 2024)
<i>Eryngium alpinum</i> L.	Daun	pra-perlakuan etanol 70% dilanjutkan natrium hipoklorit 2.5% dengan beberapa tetes Tween-80,	Nilai TFC : 33.16 $\pm$ 2.16.	Nilai TFC): Tunas in vitro (padat): 146.98 $\pm$ 5.13 (tertinggi di	(Kikowska <i>et al.</i> , 2020)

		diakhiri bilasan air suling steril autoklaf.		padat)	
<i>Curcuma larsenii</i> Maknoi & Jenjitikul	Tunas aksiler	Pra-cuci air mengalir 1 jam; etanol 70% v/v 1 menit; NaOCl 20% selama 20 menit diikuti 15% selama 15 menit; bilas 3× air suling steril masing-masing 5 menit.	Nilai TFC: Daun in vitro MS: 28.19 mg RE/g DW; Akar in vitro MS: 20.45 mg RE/g DW; pseudostem liar: 23.81 mg RE/g DW; rhizome liar: 10.49 mg RE/g DW.	Nilai TFC: Daun liar: 34.86 mg RE/g DW.	(Saensouk <i>et al.</i> , 2024)

Berdasarkan dari tabel 2, Teknik sterilisasi yang digunakan dapat berkorelasi dengan naikturunnya kandungan flavonoid, tetapi efeknya bukan satu-satunya penentu dan sering tidak dominan. Sterilisasi berperan penting dalam menekan kontaminasi dan mengurangi stres kimia berlebih, sehingga jaringan tetap viabel, tidak mengalami browning, dan memiliki kapasitas untuk memproduksi flavonoid (Alseekh *et al.*, 2020; Anikina *et al.*, 2025). Walaupun keberhasilan sterilisasi saja tidak otomatis meningkatkan kandungan flavonoid, tahap ini tetap sangat penting karena tanpa sterilisasi yang tepat kultur sulit bertahan dan hasil biosintesis dapat terganggu.

Banyak penelitian menegaskan bahwa faktor seperti komposisi media, jenis serta dosis ZPT, elisitor, pH, cahaya, hingga umur kalus dan siklus subkultur sebagai faktor utama pengendali biosintesis flavonoid (Fehér, 2019). Sterilisasi yang baik memang menjadi syarat perlu untuk memperoleh kultur yang sehat, tetapi belum cukup untuk secara langsung meningkatkan kandungan flavonoid. Meskipun demikian, sterilisasi yang moderat dan efektif tetap merupakan landasan utama agar kultur viabel dan mampu mendukung biosintesis flavonoid. Oleh karena itu, peningkatan kandungan flavonoid yang optimal hanya dapat dicapai melalui perpaduan antara teknik sterilisasi yang tepat dan pengelolaan faktor kultur lanjutan secara terarah..

SIMPULAN

Hasil literatur review menegaskan bahwa natrium hipoklorit (NaOCl) merupakan agen sterilisasi utama yang paling konsisten, efektif, ekonomis, dan relatif aman digunakan pada berbagai jenis eksplan. Skema umum berupa pra-perendaman etanol 70% singkat, dilanjutkan NaOCl dengan konsentrasi terukur, serta bilasan steril 3–5 kali terbukti menghasilkan kultur bebas kontaminan dengan viabilitas tinggi. Walaupun merkuri klorida

(HgCl₂) 0,1–0,2% masih diaplikasikan pada kasus sulit, penggunaannya semakin dibatasi karena risiko toksisitas. Alternatif tambahan seperti H₂O₂, povidone iodine, fungisida, antibiotik, maupun surfaktan dapat menjadi solusi pada eksplan dengan tingkat kontaminasi tinggi. Respons berbeda antar eksplan: biji paling toleran, nodus berisiko endofit, daun dan akar memerlukan perlakuan lembut, sedangkan rimpang butuh protokol bertahap. Teknik sterilisasi dapat memengaruhi kadar flavonoid, namun perannya bukan faktor utama. Sterilisasi terutama penting untuk menekan kontaminasi dan menjaga viabilitas jaringan agar tidak browning dan tetap mampu berproduksi.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini merupakan bagian dari hibah penelitian internal STFI dengan skema Percepatan Lektor Kepala. Terimakasih disampaikan kepada STFI dan Yayasan Hazanah untuk pendanaan yang diberikan.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad, N., Khan, P., Khan, A., Usman, M., Ali, M., Fazal, H., Durrishahwar, Uddin, M. N., Hano, C., & Abbasi, B. H. (2022). Elicitation of submerged adventitious root cultures of stevia rebaudiana with cuscuta reflexa for production of biomass and secondary metabolites. *Molecules*, 27(1). <https://doi.org/10.3390/molecules27010014>
- Ahmadpoor, F., Zare, N., Asghari, R., & Sheikhzadeh, P. (2022). Sterilization protocols and the effect of plant growth regulators on callus induction and secondary metabolites production in in vitro cultures Melia azedarach L. *AMB Express*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/s13568-022-01343-8>
- Amelia. (2021). Gambaran pasien kerusakan

- integritas jaringan ny. s dengan ulkus diabetes di Ruang Edelweis RSUD R Goeteng Taroenadibrata Purbalingga. In *Seminar Nasional Penelitian Dan Pengabdian Kepada Masyarakat*, 1127–1133.
- Amente, G., & Chimdessa, E. (2021). Control of browning in plant tissue culture: A review. *Journal of Scientific Agriculture*, 5, 67–71. <https://doi.org/10.25081/jsa.2021.v5.7266>
- Anikina, I., Kaynidenov, N., Turista, D. D. R., Kukusheva, A., Tokbergenova, Z., Tuganova, B., Seytkhanova, K., & Kaliyeva, A. (2025). Control of Contamination of Tissue Plant Cultures During in Vitro Clonal Micropropagation. *OnLine Journal of Biological Sciences*, 25(2), 333–342. <https://doi.org/10.3844/ojbsci.2025.333.342>
- Ardiansyah, R., Sekar Wulandari, A., Subandy, B., & Fitriani, Y. (2015). Fagraea fragrans ROXB) Explant Sterilization and Shoot Induction Techniques in Micropropagation of Tembesu (Fagraea fragrans Roxb. *Jurnal Silvikultur Tropika*, 05(3), 167–173.
- Asmono, S. L., Wardana, R., & Rahmawati. (2022). Optimization of the sterilization method for leaf explant Robusta BP 308 coffee in vitro. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 980(1), 1–9. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/980/1/012001>
- Awere, C. O., Rakkammal, K., Mwaura, M. M., Anadebe, V. C., & Ramesh, M. (2024). Hairy-root technology: A metabolic engineering tool and specialized metabolite pathway elucidation and production of secondary metabolites. A review. *Results in Engineering*, 23(August), 102697. <https://doi.org/10.1016/j.rineng.2024.102697>
- Bansal, Y., Mujib, A., Mamgain, J., Kumar, S., Dewir, Y. H., & Magyar-Tábori, K. (2024). Synthesis and Accumulation of Phytocompounds in Field-, Tissue-Culture Grown (Stress) Root Tissues and Simultaneous Defense Response Activity in Glycyrrhiza glabra L. *Sustainability (Switzerland)*, 16(4), 1–5. <https://doi.org/10.3390/su16041613>
- Chavan, J. J., Kshirsagar, P. R., Jadhav, S. G., Nalavade, V. M., Gurme, S. T., & Pai, S. R. (2021). Elicitor-mediated enhancement of biomass, polyphenols, mangiferin production and antioxidant activities in callus cultures of Salacia chinensis L. *3 Biotech*, 11(6), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02836-2>
- Dias, M. C., Pinto, D. C. G. A., & Silva, A. M. S. (2021). Plant flavonoids: Chemical characteristics and biological activity. *Molecules*, 26(17), 1–16. <https://doi.org/10.3390/molecules26175377>
- EL-BANNA, H. Y., ALASKAR, A. A., JAKOVLJEVIĆ, D. Z., ABDELAAL, K., HAROUN, S. A., ABU-ZIADA5, L. M., ABBAS, M. A., & GAMEL, R. M. E. (2024). Essential oil constituents and secondary metabolites of Mentha viridis under tissue culture technique using violet visible light emitting diodes (LEDs). *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 52(2), 13684. <https://doi.org/https://doi.org/10.15835/nbha52213684>
- Elateeq, A. A., Zarad, M. M., Gabr, A. M. M., Ebrahim, H. S., Ullah, S., Elhamamsy, S. M., Nada, R. S., Saad, Z. H., Soliman, M. N. A., El-khawaga, H. A., Alshammari, W. S., Tanko, W. S., & Hussein, H. A. A. (2025). Differential Bio-Elicitor Effects on Bioactive Compound Production in Cichorium intybus Root Callus Cultures. *Horticulturae*, 11(6), 1–34. <https://doi.org/10.3390/horticulturae11060678>
- Elsherif, D. E., Safhi, F. A., El-Esawy, M. A., Mohammed, A. T., Alaziz, O. A., Subudhi, P. K., & Shaban, A. S. (2025). Biofortified Calcium Phosphate Nanoparticles Elicit Secondary Metabolite Production in Carob Callus via Biosynthetic Pathway Activation. *Plants*, 14(14), 2093. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/plants14142093>
- Elsherif, D. E., Safhi, F. A., Khalifa, A. M., & Ragab, G. A. (2024). Upregulated synthesis and production of bioactive compounds in Lotus arabicus L. by in vitro feeding with dried powder of date palm seeds. *BMC Plant Biology*, 24, 1–13. <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/s128>

- 70-024-04919-7
- Fatima, T., Mujib, A., Bansal, Y., Dewir, Y. H., & Mandler-Drienyovszki, N. (2024). Indirect Organogenesis of *Calendula officinalis* L. and Comparative Phytochemical Studies of Field-Grown and In Vitro-Regenerated Tissues. *Agronomy*, 14(8), 1–5. <https://doi.org/10.3390/agronomy14081743>
- Fehér, A. (2019). Callus, dedifferentiation, totipotency, somatic embryogenesis: What these terms mean in the era of molecular plant biology? *Frontiers in Plant Science*, 10(April), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00536>
- Gundamaraju, R., & Vemuri, R. (2014). Pathophysiology of Greedy Colon and Diabetes: Role of Atropine in worsening of Diabetes. *Euroasian Journal of Hepato-Gastroenterology*, 4(1), 51–54. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10018-1096>
- Han-Yong, P., Kyung-Su, K., Ak, G., Zengin, G., Cziáky, Z., Jekő, J., Adaikalam, K., Song, K., Kim, D.-H., & Sivanesan, I. (2021). Establishment of a Rapid Micropropagation System for *Kaempferia parviflora* Wall. Ex Baker: Phytochemical Analysis of Leaf Extracts and Evaluation of Biological Activities. *Plants*, 10(4), 698. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/plants10040698>
- Hesami, M., Naderi, R., & Tohidfar, M. (2019). Modeling and optimizing In vitro sterilization of chrysanthemum via multilayer perceptron-non-dominated sorting genetic algorithm-II (MLP-NSGAI). *Frontiers in Plant Science*, 10(March), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00282>
- Huang, X., Yao, J., Zhao, Y., Xie, D., Jiang, X., & Xu, Z. (2016). Efficient rutin and quercetin biosynthesis through flavonoids-related gene expression in *Fagopyrum tataricum* gaertn. Hairy root cultures with UV-B irradiation. *Frontiers in Plant Science*, 7(FEB2016), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00063>
- Jeharut, F., Hepilita, A., Daar, Y. F., & Gabriel. (2021). Literatur Review: Hubungan Kecemasan Dengan Kadar Gula Darah Pada Penderita Diabetes Melitus Tipe 2. *48 Jwk*, 6(1), 2548–4702.
- Junairiah, J., Mahmuda, A., Manuhara, Y. S. W., Ni'Matuzahroh, & Sulistyorini, L. (2019). Callus Induction and Bioactive Compounds from *Piper betle* L. var *nigra*. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 217(1), 1–9. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/217/1/012026>
- Kaban, S. M. P., Restiani, R., & Aditiyarini, D. (2024). Effect of Plant Growth Regulators (PGRs) on Biomass and Flavonoid Production of *Talinum paniculatum* Callus Culture. *Jurnal Biodjati*, 9(1), 11–25. <https://doi.org/10.15575/biodjati.v9i1.33788>
- Karuppaiya, P., & Wu, J. (2022). Production of podophyllotoxin, kaempferol and quercetin in callogenesis of *Dysosma versipellis* — an endangered medicinal plant. *South African Journal of Botany*, 151, 360–366. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.03.022>
- Khaerasani, I., Prihastanti, E., & Haryanti, S. (2017). Pertumbuhan Kalus Eksplan Rimpang Jahe Merah (*Zingiber officinale* Rosc.) pada Berbagai Konsentrasi Sukrosa Secara In Vitro. *Buletin Anatomi Dan Fisiologi*, 2(1), 43. <https://doi.org/10.14710/baf.2.1.2017.43-49>
- Kikowska, M., Thiem, B., Szopa, A., & Ekiert, H. (2020). Accumulation of valuable secondary metabolites: phenolic acids and flavonoids in different in vitro systems of shoot cultures of the endangered plant species—*Eryngium alpinum* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 141(2), 381–391. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01795-5>
- Le, V., Sukhikh, A., Larichev, T., Ivanova, S., Prosekov, A., & Dmitrieva, A. (2023). Isolation of the Main Biologically Active Substances and Phytochemical Analysis of *Ginkgo biloba* Callus Culture Extracts. *Molecules*, 28(4), 1–3. <https://doi.org/10.3390/molecules28041560>
- Li, W., Jianping, P., Chen, X., Senhui, G., & Xilin, O. (2025). The Chemical Composition, Pharmacological Activity, Quality Control, Toxicity, and Pharmacokinetics of the Genus *Clinopodium* L. *Molecules*, 30(11), 2425. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/mol>

- ecules30112425
- Liu, C., Fan, H., Zhang, J., Wu, J., Zhou, M., Cao, F., Tao, G., & Zhou, X. (2024). Combating browning: mechanisms and management strategies in in vitro culture of economic woody plants. *Forestry Research*, 4. <https://doi.org/10.48130/forres-0024-0026>
- Łukaszyk, A., Miceli, N., Taviano, M. F., & Dav, F. (2023). *subvelutina as a Source of Bioactive Phenolic Metabolites*.
- Madanakumar, A. J., Murukan, G., Lawarence, B., & Kumaraswamy, M. (2017). Isolation, purification of quercetin from in vitro cell suspension culture of caesalpinia pulcherrima and its analysis by HPLC-DAD and NMR. *Pharmacognosy Journal*, 9(6), s44–s51. <https://doi.org/10.5530/pj.2017.6s.156>
- Mahadi, I., Syafi'i, W., & Sari, Y. (2016). Callus Induction of Calamansi (Citrus microcarpa) Using 2,4-D and BAP Hormones by in vitro Methods. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*, 21(2), 84–89. <https://doi.org/10.18343/jipi.21.2.84>
- Mamdouh, D., Mahgoub, H. A. M., Gabr, A. M. M., Ewais, E. A., & Smetanska, I. (2021). Genetic stability, phenolic, flavonoid, ferulic acid contents, and antioxidant activity of micropropagated lycium schweinfurthii plants. *Plants*, 10(10). <https://doi.org/10.3390/plants10102089>
- Manchanda, P., Kaur, H., Mankoo, R. K., Kaur, A., Kaur, J., Kaur, S., & Sidhu, G. S. (2023). Optimization of extraction of bioactive phenolics and their antioxidant potential from callus and leaf extracts of Citrus sinensis (L.) Osbeck, C. reticulata Blanco and C. maxima (Burm.) Merr. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 17(2), 1343–1353. <https://doi.org/10.1007/s11694-022-01695-6>
- Nasrat, M. N., Sakimin, S. Z., & Hakiman, M. (2022). Phytochemicals and Antioxidant Activities of Conventionally Propagated Nodal Segment and In Vitro-Induced Callus of Bougainvillea glabra Choisy Using Different Solvents. *Horticulturae*, 8(8), 712. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/horticulturae8080712>
- Paradiso, A., Durante, M., Caretto, S., & De Paolis, A. (2024). Establishment of *Dittrichia viscosa* L. Hairy Roots and Improvement of Bioactive Compound Production. *Plants*, 13(22), 1–21. <https://doi.org/10.3390/plants13223236>
- Park, H. Y., Kim, K. S., Ak, G., Zengin, G., Cziáky, Z., Jekő, J., Adaikalam, K., Song, K., Kim, D. H., & Sivanesan, I. (2021). Establishment of a rapid micropropagation system for kaempferia parviflora wall. Ex baker: Phytochemical analysis of leaf extracts and evaluation of biological activities. *Plants*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/plants10040698>
- Park, J. S., Seong, Z. K., Kim, M. S., Ha, J. H., Moon, K. B., Lee, H. J., Lee, H. K., Jeon, J. H., Park, S. U., & Kim, H. S. (2020). Production of flavonoids in callus cultures of Sophora flavescens aiton. *Plants*, 9(6), 1–13. <https://doi.org/10.3390/plants9060688>
- Paudel, M. R., Sharma, S., Pant, P. R. J., Wagner, S. H., Gurung, P., Pant, K. K., & Pant, B. (2025). Antioxidant and cytotoxic properties of protocorm-derived phenol-rich fractions of Dendrobium amoenum. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 25, 1–11. <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/s12906-025-04810-4>
- Permadi, N., Prismantoro, D., Reitza, P., Vasall, N., Sheelmarevaa, F. A., Nurjanah, S., Nurzaman, M., Alhasnawi, A. N., Doni, F., & Julaeha, E. (2025). Modern and traditional strategies for controlling microbial contamination in plant Micropropagation: Current insights and future Perspectives. *Current Research in Biotechnology*, 100337. <https://doi.org/10.1016/j.crbiot.2025.100337>
- PPNI. (2016). *Standar diagnosis keperawatan indonesia: definisi dan indikator diagnostik*. DPP PPNI.
- Putri, R. K., Firmansyah, H., & Jannah, R. M. (2024). Induksi Organogenesis Eksplan Cauliflower pada Media Cair dengan Beberapa Perlakuan Sterilisasi. *Agriculture and Biological Technology*, 1(2), 65–70. <https://doi.org/10.61761/agiotech.1.2.65-70>
- Qahtan, A. A., Faisal, M., Alatar, A. A., & Abdel-Salam, E. M. (2022). Callus-Mediated High-Frequency Plant Regeneration,

- Phytochemical Profiling, Antioxidant Activity and Genetic Stability in *Ruta chalepensis* L. *Plants*, 11(12). <https://doi.org/10.3390/plants11121614>
- Rahayu, T., & Mardini, U. (2015). Respon Eksplan Nodus dan Daun Tanaman Binahong (*Anredera cordifolia* L.) pada Media MS dengan Variasi Konsentrasi BAP. *Seminar Nasional XII Pendidikan Biologi FKIP UNS*, 14(2), 657–661.
- Rofii, M., Warsito, B. E., Santoso, A., & Ulliya, S. (2018). Diagnosa keperawatan yang sering ditegakkan perawat pada pasien tuberkulosis paru di rumah sakit. *Jurnal Kepemimpinan Dan Manajemen Keperawatan*, 1(2), 1. <https://doi.org/10.32584/jkmk.v1i2.139>
- Roy, A., Khan, A., Ahmad, I., Alghamdi, S., Rajab, B. S., Babalghith, A. O., Alshahrani, M. Y., Islam, S., & Islam, M. R. (2022). Flavonoids a Bioactive Compound from Medicinal Plants and Its Therapeutic Applications. *BioMed Research International*, 2022. <https://doi.org/https://doi.org/10.1155/2022/5445291>
- Saensouk, S., Benjamin, S., Chumroenphat, T., & Saensouk, P. (2024). In Vitro Propagation, Evaluation of Antioxidant Activities, and Phytochemical Profiling of Wild and In Vitro-Cultured Plants of *Curcuma larsenii* Maknoi & Jenjitikul—A Rare Plant Species in Thailand. *Horticulturae*, 10(11), 1–3. <https://doi.org/10.3390/horticulturae10111181>
- Saensouk, S., Sonthongphithak, P., Chumroenphat, T., Muangsan, N., Souladeth, P., & Saensouk, P. (2025). In Vitro Multiplication, Antioxidant Activity, and Phytochemical Profiling of Wild and In Vitro-Cultured Plants of *Kaempferia larsenii* Sirirugsa—A Rare Plant Species in Thailand. *Horticulturae*, 11(3), 281. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/horticulturae11030281>
- Samadi, S., Saharkhiz, M. J., Azizi, M., Samiei, L., & Ghorbanpour, M. (2023). Exposure to single-walled carbon nanotubes differentially affect in vitro germination, biochemical and antioxidant properties of *Thymus daenensis* celak. seedlings. *BMC Plant Biology*, 23(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12870-023-04599-9>
- Sari, D. N. M., & Mukhamad, M. (2021). Gambaran Pengelolaan Gangguan Integritas Kulit/Jaringan pada Pasien Post Op Debridement atas Indikasi Ulkus Dm Pedis Dextra di Desa Lungge Kabupaten Temanggung. *Indonesian Journal of Nursing Research (IJNR)*, 4(2), 99–105.
- Sawitri, E. N. H. J. S. (2015). Gejala Gastrointestinal pada Penderita Diabetes Melitus dengan Status Glikemik Tidak Terkontrol. In *Molluca Medica* (Vol. 8, Issue 1, pp. 1–9).
- Sayed, S. S., Gabr, A. M. M., Amin, M. A., & Taha, L. S. (2020). Biochemical characterization of micropropagated *Ceratonia siliqua* L. under effect of growth regulators and light quality. *Bulletin of the National Research Centre*, 44(1). <https://doi.org/10.1186/s42269-020-0282-8>
- Serra, E. B., Ferreira, A. G. N., Pascoal, L. M., & Rolim, I. L. T. P. (2020). Nursing diagnoses in diabetic patients: An integrative review. *Revista Enfermagem*, 28, 1–9. <https://doi.org/10.12957/reuerj.2020.48274>
- Syam, N., Numba, S., & Imaniar, M. (2024). Increasing Flavonoid Compounds Through The Use Of Elicitors In Callus Culture *Catharanthus Roseus* L. *Jurnal Penelitian Pertanian Terapan*, 24(3), 366–374. <https://doi.org/10.25181/jppt.v24i3.3406>
- Wang, S., Xiong, F., Liu, Y., & Feng, Z. (2024). Exploring flavonoid intake and all-cause mortality in diverse health conditions: Insights from NHANES 2007–2010 and 2017–2018. *Nutrition*, 127, 112556. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2024.112556>
- Widyastuti, D. A., Santosa, D., Nuringtyas, T. R., & Rohman, A. (2024). Callus induction of red ginger (*Zingiber officinale* var. *rubrum*) with 2,4-D and Kinetin combination to enhance total phenolic and flavonoid content. *IOP Conference Series. Earth and Environmental Science*, 1364(1), 12051. <https://doi.org/https://doi.org/10.1088/1755-1315/1364/1/012051>
- Zeng, X., Wang, X., Zeng, Y., Hou, J., & Liu, Z. (2023). Flavonoid Metabolome-Based Active Ingredient Mining and Callus Induction in *Catalpa bungei* C. A. Mey. *Forests*, 14(9), 1–16.

<https://doi.org/10.3390/f14091814>

- Zengin, G., Cziáky, Z., Jekő, J., Kang, K. W., Lorenzo, J. M., & Sivanesan, I. (2023). Phytochemical Composition and Biological Activities of Extracts from Early, Mature, and Germinated Somatic Embryos of *Cotyledon orbiculata* L. *Plants*, 12(5).
<https://doi.org/10.3390/plants12051065>
- Zinabu, D., Gebre, E., & Shekata, J. (2018). *Explants Sterilization Protocol for In-vitro Propagation of Elite Enset (Ensete ventricosum (Welw.) Chessman) Cultivars*.