

PENGARUH 2,4-DIKLOROFENOKSIASETAT (2,4-D) DAN BENZYL AMINOPURIN (BAP) TERHADAP PERTUMBUHAN KALUS DAUN BINAHONG (*ANREDERA CORDIFOLIA* L.) SERTA ANALISIS KANDUNGAN FLAVONOID TOTAL

Lili Sugiyarto, Paramita Cahyaningrum Kuswandi

Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam UNY
Jl. Colombo No. 1 Yogyakarta 55281
e-mail: liloels@gmail.com

Abstrak

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh penambahan beberapa konsentrasi ZPT (zat pengatur tumbuh) pada media MS (*Murashige and Skoog*) terhadap pertumbuhan kalus daun binahong dan kadar flavonoid total. Metode yang digunakan dengan perbanyak kalus dengan sumber eksplan daun binahong dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Eksplan daun ditanam pada media MS yang mengandung konsentrasi 2,4 D berbeda (1;2;3ppm), 0,5ppm IBA+0,5ppm BAP; 0,5ppm IBA+1,0 ppm BAP ; 1,0 ppm IBA+0,5 ppm BAP, masing-masing 15 ulangan. Parameter yang diamati adalah waktu muncul kalus, tipe kalus (warna dan tekstur kalus), persentase terbentuknya kalus, diameter kalus dan kadar flavonoid total. Hasil penelitian menunjukkan pertumbuhan kalus optimal pada minggu ke-3 untuk semua perlakuan, sedangkan memasuki minggu ke-4 eksplan yang muncul kalus mengalami penurunan dan ada yang stagnan (tetap). Kadar flavonoid total sampel daun segar lebih tinggi dibandingkan dengan sampel kalus.

Kata kunci : 2,4-D, BAP, pertumbuhan kalus, daun binahong, kadar flavonoid total

Abstract

The aim of this research was to study the effect of various concentration of Plant Growth Regulator in MS (Murashige and Skoog) media on callus growth of binahong leaf and total flavonoid content. The method used in the propagation of callus was the leaf explant of binahong with a Completely Randomized Design (CRD). The leaf explants were planted on MS media with different 2,4-D concentrations (1;2;3 ppm), 0,5ppm IBA+0,5ppm BAP; 0,5ppm IBA+1,0 ppm BAP ; 1,0 ppm IBA+0,5 ppm BAP, each with 15 repetition. The parameters observed in this research were initiation time, type, colour, diameter, the number of callus and total flavonoid content. The result showed that the optimum growth of callus is at 3 weeks and after that it declined or stayed stagnant. The result of the analysis of variance (ANOVA) showed that there is no significant difference in the media used in this research. The total flavonoid content of fresh leaf sample is higher than callus sample.

Keywords: 2,4-D, BAP, callus growth, binahong leaves, total flavonoid content

PENDAHULUAN

Binahong (*Anredera cordifolia* L.) merupakan tanaman obat berpotensi mengobati beberapa jenis penyakit. Di negara Eropa maupun Amerika tanaman ini cukup dikenal, tetapi para ahli belum

tertarik untuk meneliti tanaman ini lebih mendalam, padahal berbagi khasiat sebagai obat telah diketahui. Bagian dari tanaman binahong hampir semuanya dapat dimanfaatkan, mulai dari batang, akar, bunga, dan daun, akan tetapi bagian yang banyak

digunakan sebagai bahan obat herbal adalah bagian daun (Manoi, 2009).

Teknik *in vitro* atau kultur jaringan merupakan salah satu teknik yang dapat digunakan untuk induksi kalus daun binahong untuk menghasilkan metabolit sekunder. Kelebihan kultur jaringan dalam produksi metabolit sekunder dibandingkan dengan tanaman utuh adalah tidak adanya keterbatasan iklim, tidak memerlukan lahan yang luas, dan senyawa bioaktif yang dihasilkan secara kontinyu dalam keadaan yang terkontrol (Collin dan Edward, 1998). Keberhasilan kultur jaringan ditentukan oleh beberapa faktor, antara lain komposisi zat pengatur tumbuh, sumber eksplan dan jenis tanaman. Zat pengatur tumbuh (ZPT) yang sering digunakan dalam kultur jaringan adalah auksin dan sitokinin (Gunawan, 1992). Auksin (*2,4 Dichlorophenoxyacetic acid*), biasanya digunakan untuk menginduksi pembentukan kalus (Suryowinata, 1996). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penambahan beberapa konsentrasi ZPT (zat pengatur tumbuh) pada media MS (*Murashige and Skoog*) terhadap pertumbuhan kalus dan kadar flavonoid total daun binahong dan kadar flavonoid total.

Karakteristik pada setiap kalus berbeda-beda, terdapat kalus dengan tekstur lembut (*soft*), dan remah (*friable*), keras dan kompak (Thomas dan Davey, 1975).

Karakteristik kalus sendiri tergantung pada komposisi media pengkulturan, khususnya zat pengatur tumbuh, dan jenis eksplan. Kalus dengan tekstur kompak akan menghasilkan metabolit sekunder yang lebih banyak dibandingkan kalus dengan tekstur meremah. Metabolit sekunder yang dihasilkan dari kultur kalus biasanya lebih banyak jenisnya, karena seringkali timbul zat-zat alkaloid atau senyawa-senyawa lain yang sangat berguna untuk pengobatan (Hendaryono dan Wijayani, 1994).

Flavonoid merupakan salah satu komponen fitokimia yang khas pada tumbuhan hijau, dan biasanya ditemukan dalam bentuk senyawa campuran. Flavonoid merupakan senyawa polifenol yang terdiri dari 15 atom Karbon dalam inti dasarnya dan tersusun dalam konfigurasi C6-C3-C6, yaitu dua cincin aromatik yang dihubungkan oleh satuan tiga karbon yang dapat maupun tidak dapat membentuk cincin ketiga

METODE PENELITIAN

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan, Fakultas MIPA, Universitas Negeri Yogyakarta. Bahan yang digunakan adalah eksplan daun binahong, media MS (*Murashige and Skoog*), dan ZPT (2,4-D dan BAP dengan beberapa variasi konsentrasi. Untuk sterilisasi digunakan bahan-bahan di antaranya detergen, *aquadest* steril,

alkohol 70%, *clorox* 10%, dan *tissue*. Sedangkan untuk sterilisasi alat digunakan aluminium foil dan kertas payung. Pembentukan kalus akan ditumbuhkan pada media MS yang mengandung 2,4 D dengan konsentrasi berbeda (1;2;3ppm), 0,5ppm IBA+0,5ppm BAP; 0,5ppm IBA+1,0 ppm BAP ; 1,0 ppm IBA+0,5 ppm BAP, masing-masing 15 ulangan. Sebelum ditanam, terlebih dahulu daun binahong disterilisasi dengan mencuci bersih menggunakan larutan detergen selama 15 menit. Kemudian dibilas hingga bersih menggunakan air mengalir, dan kemudian dimasukkan ke dalam erlemmeyer sebelum dimasukkan ke dalam LAF. Sterilisasi eksplan dilakukan dengan menggunakan alkohol 70%, dilanjutkan dengan larutan *clorox* 10%. Eksplan dibilas menggunakan *aquadest* steril sebanyak 3 kali. Data diambil seminggu sekali selama 4 minggu. Variabel-variabel yang diamati adalah waktu inisiasi kalus, morfologi kalus, diameter kalus, persentase terbentuknya kalus.

Data bobot persentase eksplan yang muncul kalus dianalisis varian pada menurut Rancangan Acak Lengkap (RAL). Analisis dilanjutkan dengan uji DMRT (*Duncan's Multiple Range Test*) jika ada perbedaan antarperlakuan.

Tabel 1. Perlakuan Konsentrasi ZPT

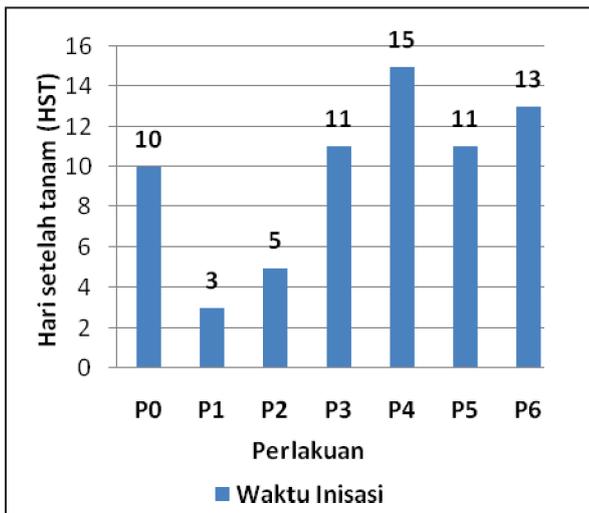
No	Perlakuan	Jumlah Eksplan
1	MS	15
2	MS+1 ppm 2,4 D	15
3	MS+2 ppm 2,4 D	15
4	MS+3 ppm 2,4 D	15
5	MS+0,5 ppm IBA+0,5 ppm BAP	15
6	MS+0,5 ppm IBA+1,0 ppm BAP	15
7	MS+1,0 ppm IBA+0,5 ppm BAP	15
Total		105

Kadar flavonoid total dianalisis menggunakan Spektrofotometer UV VIS berdasarkan metode yang dilakukan Chang *et al.* (2002). Dalam perlakuan *in vitro*, dibutuhkan alat-alat berupa botol-botol media dan tutup tahan panas atau *aluminium foil*. Selain itu juga akan digunakan pinset, lampu bunsen, scalpel, petridish, beaker, *magnetic stirrer*, autoklaf, timbangan digital, label, dan almari *Laminair air flow* (LAF).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Waktu Munculnya Kalus

Munculnya kalus pada media 2,4-D 1 ppm adalah 3 hari setelah tanam (hst), diikuti 2,4-D 2ppm 5 hst dan 2,4D 3ppm, sedangkan kalus pada media kontrol muncul pada 10 hst dan media kombinasi IBA dan BAP setelah 10 hst (Gambar 1).



Gambar 1. Grafik Hubungan Medium Perlakuan dengan Hari Muncul Kalus (hst).

Keterangan gambar:

P0 : MS (kontrol)

P1 : MS+1ppm 2,4-D

P2 : MS+2ppm 2,4-D

P3 : MS+3ppm 2,4-D

P4 : MS+0,5ppm IBA+0,5ppmBAP

P5 : MS+0,5ppmIBA+1ppm BAP

P6 : MS+1ppmIBA+0,5ppmBAP

Penambahan 2,4-D dalam media kultur akan merangsang pembelahan dan pembesaran sel pada eksplan sehingga dapat memacu pembentukan dan pertumbuhan kalus serta meningkatkan senyawa kimia alami flavonoid (Bekti dkk., 2003). Hal

serupa juga disampaikan oleh Pierik (1987), yang menyatakan bahwa 2,4-D dapat menyebabkan elongasi sel, pembengkakan jaringan dan pembentukan kalus. Munculnya kalus pada media 2,4-D 1 ppm adalah 3 hari setelah tanam (hst), diikuti 2,4-D 2ppm 5 hst dan 2,4D 3ppm, sedangkan kalus pada media kontrol muncul pada 10 hst dan media kombinasi IBA dan BAP setelah 10 hst. Senyawa 2,4-D merupakan salah satu jenis auksin yang sangat efektif untuk menginduksi pembentukan kalus seperti yang terjadi pada induksi kalus daun binahong ini. Walaupun auksin yang berperan utama, terkadang sitokinin juga diperlukan untuk proliferasi kalus, namun pada penelitian ini, 2,4-D yang lebih efektif untuk menginduksi kalus lebih cepat.

Morfologi Kalus (Tipe Dan Warna)

Pada umur 4 minggu setelah tanam, dengan konsentrasi 2,4-D (1 dan 2 ppm), kalus yang terbentuk berwarna putih bening, berair dan kompak, sedangkan pada

Tabel 2. Morfologi Kalus yang Terbentuk

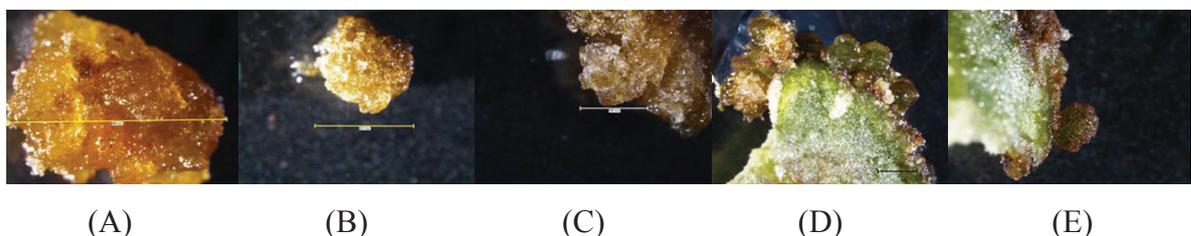
Media	Tekstur kalus	Warna kalus
MS (Kontrol)	kompak	Putih bening, berair
MS + 1 ppm 2,4-D	kompak	Putih bening, berair
MS + 2 ppm 2,4-D	kompak	Putih bening, berair
MS + 3 ppm 2,4-D	remah	Putih
MS + 0,5 ppm IBA + 0,5 ppm BAP	kompak	Hijau
MS + 0,5 ppm IBA + 1 ppp BAP	kompak	Hijau
MS + 1 ppm IBA + 0,5 ppm BAP	kompak	hijau

konsentrasi 3 ppm kalus yang muncul berwarna putih susu dan remah. Berdasarkan tekstur dan komposisi selnya, kalus dapat dibedakan menjadi kalus yang kompak dan remah. Kalus kompak mempunyai tekstur padat dan keras, yang tersusun dari sel-sel kecil yang sangat rapat, sedangkan kalus remah mempunyai tekstur lunak dan tersusun dari sel-sel dengan ruang antar sel yang banyak. Perbedaan struktur kalus menimbulkan adanya perbedaan kemampuan memproduksi metabolit sekunder. Pada media kombinasi IBA dan BAP, menghasilkan kalus yang kompak dan berwarna hijau. Warna kalus yang hijau disebabkan adanya konsentrasi sitokinin (BAP) dalam media. Sitokinin yang ditambahkan mampu mengaktifkan proses-proses metabolisme dan sintesis protein yang mampu menghambat perombakan butir-butir klorofil Wattimena (1991) dalam (Wardani, 2004). Penampakan kalus pada media 2,4-D (1 dan 2ppm), awalnya berwarna putih bening hingga

minggu ke-4, kemudian memasuki minggu ke-5 warna kalus berubah warnanya menjadi coklat muda dan akhirnya kehitaman setelah di subkultur. Hal ini disebabkan adanya metabolisme senyawa fenol yang berlebihan pada jaringan yang mulai terbentuk. Warna kalus yang kecoklatan terdapat pada hampir semua perlakuan yang terbentuk kalus dan sering terangsang akibat sterilisasi eksplan S. Andaryani (2010) dalam (Indah dan Erma-vitalini, 2013). Pada permukaan bawah kalus juga terlihat jaringan yang berair, hal ini karena permukaan bawah langsung bersentuhan dengan media dan berperan sebagai area penyerapan media. Foto kalus pada minggu ke-8 dapat dilihat pada Gambar 2.

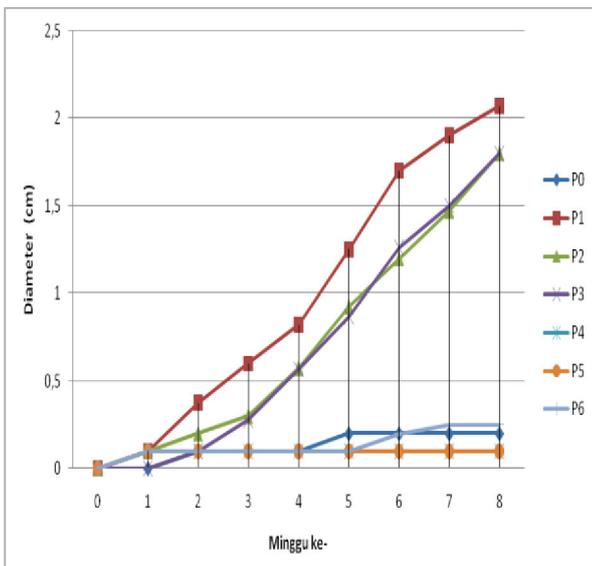
Rerata Diameter Kalus

Rerata diameter tertinggi selama 8 minggu pada media 2,4-D 1 ppm mencapai 2,07 cm, diikuti 3 ppm dan 2 ppm sekitar



Gambar 2. Morfologi Kalus dengan Mikroskop Stereo (A) 1 ppm 2,4-D; (B) 2 ppm 2,4-D; (C) 3 ppm 2,4-D; (D) 1 ppm IBA+0,5 ppm BAP; (E) 0,5 ppm IBA+0,5 ppm BAP

1,8 cm, sedangkan pada media kombinasi diameter kalus kurang dari 0,3 cm. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa 2,4-D sebagai ZPT tunggal mampu menginduksi kalus daun binahong paling banyak dibandingkan yang kombinasi IBA dan BAP. Konsentrasi 2,4-D yang digunakan, 1 ppm lebih optimal dibandingkan dengan 2 dan 3.

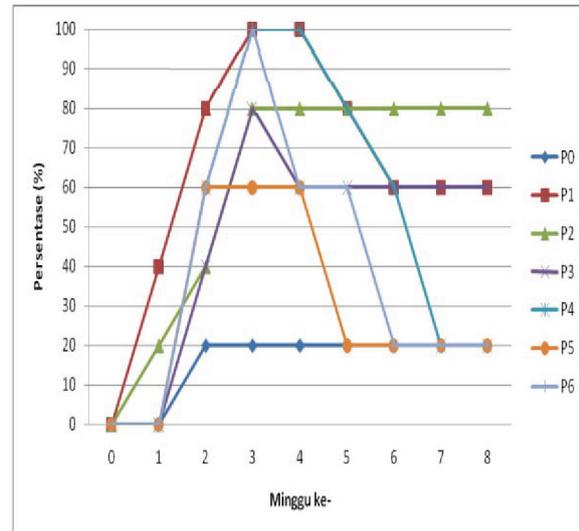


Gambar 3. Grafik Rerata Diameter Kalus Selama 8 Minggu

Persentase Kalus yang Muncul

Persentase kalus yang muncul tertinggi pada medium 1 ppm 2,4-D dan kombinasi 0,5 ppm IBA+0,5 ppm BAP yang mencapai 100%, diikuti 2 ppm 2,4-D mencapai 80%, 3 perlakuan media dengan ZPT yang mencapai 60%, dan terakhir kontrol yang hanya 20%. Persentase kalus yang muncul optimal pada minggu ke-3, sedangkan memasuki minggu ke-4 eksplan yang muncul

kalus mengalami penurunan dan ada yang stagnan (tetap). Persentase kalus yang rendah pada eksplan daun binahong kebanyakan



Gambar 4. Grafik Persentase Eksplan yang Muncul Kalus

terkontaminasi oleh bakteri, yang menghambat tumbuhnya kalus, sehingga perlu lebih hati-hati dan meningkatkan kebersihan dan kesterilan bekerja pada waktu di dalam LAF.

Kadar Flavonoid Total

Kadar flavonoid total dari sampel kalus daun binahong bertekstur kompak (2,4-D 2 ppm) diperoleh 0,0019%, sampel kalus tekstur remah (2,4-D 3 ppm) sekitar 0,0017%, dan sampel daun sekitar 0,015%. Dari hasil analisis ternyata kadar flavonoid total sampel daun masih relatif lebih tinggi dibandingkan dari dua sampel kalus. Dan dari dua sampel kalus yang berbeda tekstur juga tidak berbeda nyata. Robbins *et al.* (1992) dalam (Bekti dkk., 2003),

Tabel 3. Kadar Flavonoid Total Kalus Daun Binahong

Sampel	Kadar flavonoid total (%)
Kalus media 2,4D 2 ppm (kompak)	0,0019
Kalus media 2,4D 3 ppm (remah)	0,0017
Daun	0,015

menyatakan bahwa untuk menghasilkan fenol secara *in vitro*, tidak hanya dibutuhkan zat pengatur tumbuh saja, tetapi juga diperlukan unsur lain seperti kasein hidrolisis, asam amino, dan NH_4NO_3 untuk membantu pertumbuhan kalus dan produksi senyawa kimia.

KESIMPULAN

Waktu inisiasi pembentukan kalus daun binahong pada media 2,4-D 1 ppm dan 2 ppm relatif lebih cepat yaitu 3 dan 5 (hst). Penambahan 2,4-D (1 dan 2 ppm) dalam media dapat menginduksi kalus daun binahong bertipe kompak dan berwarna putih bening dan berair, dan kalus pada media 2,4-D 3 ppm bertipe remah dan berwarna putih. Sedangkan pada media kombinasi IBA dan BAP, kalus yang muncul bertipe kompak dan berwarna hijau. Rerata diameter tertinggi selama 8 minggu pada media 2,4-D 1 ppm mencapai 2,07 cm, diikuti 3 ppm dan 2 ppm sekitar 1,8 cm, sedangkan pada media kombinasi diameter kalus kurang dari 0,3 cm. Persentase kalus

yang muncul tertinggi pada medium 1 ppm 2,4-D dan kombinasi 0,5 ppm IBA+0,5 ppm BAP yang mencapai 100%, diikuti 2 ppm 2,4-D mencapai 80%, 3 perlakuan media dengan ZPT yang mencapai 60%, dan terakhir kontrol yang hanya 20%. Pertumbuhan kalus optimal pada minggu ke-3 untuk semua perlakuan, sedangkan memasuki minggu ke-4 eksplan yang muncul kalus mengalami penurunan dan ada yang stagnan (tetap). Kadar total flavonoid sampel daun lebih tinggi dibandingkan dengan sampel kalus.

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan menggunakan variasi konsentrasi ZPT yang berbeda untuk menghasilkan kalus yang kandungan flavonoid totalnya lebih tinggi dari daun segar.

DAFTAR PUSTAKA

- Bekti, R., Solichatun, E. Anggarwulan. 2003. Pengaruh asam 2,4-diklorofenoksiasetat (2,4-D) terhadap pembentukan dan pertumbuhan kalus serta kandungan flavonoid kultur kalus *acalypha indica* L. *Biofarmasi*. Vol. 1, No. 1, ISSN: 1693-2242.
- Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M., Chern, J.C. 2002. Estimation of total flavonoid, content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J Food. Drug Anal.* Vol. 10, 178-182.
- Collin, H.A. & Edward, S. 1998. *Plant cell culture*. UK: BIOS Scientific Publisher.
- Gunawan, L.W. 1992. *Teknik kultur jaringan tumbuhan*. Bogor: PAU IPB.

- Hendaryono, D.P.S & Wijayani, A. 1994. *Teknik kultur jaringan*. Yogyakarta: Kanisius.
- Indah, P.N. dan Ermavitalini, D. 2013. Induksi kalus daun nyamplung (*calophyllum inophyllum* Linn) pada beberapa kombinasi konsentrasi 6-benzylaminopurine (BAP) dan 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). *Jurnal Sains dan Seni Pomits*. Vol. 2, No. 1, 2337-3520.
- Manoi, F. 2009. "Binahong (*Anredera cordifolia*) sebagai obat". *Warta Penelitian dan Pengembangan Tanaman Industri*. Vol. 15, No. 1, 3-5.
- Pierik, R.M.L. 1987. *In vitro culture of higher plants*. Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht. The Netherlands. p71.
- Suryowinata, M. 1996. *Pemuliaan tanaman secara in vitro*. Yogyakarta: Kanisius.
- Thomas, E. dan Davey, M.R. 1975. *From single cell to plant*. London: Wykehan Publisher ltd.
- Wardani, D.P., Solichatun, dan Setyawan, A.D. 2004. Pertumbuhan dan produksi saponin kultur kalus *talinum paniculatum* gaertn pada variasi penambahan asam 2,4-diklorofenoksi asetat (2,4-D) dan kine-tin. *Biofarmasi*. Vol. 2. No. 1, 35-43.