

**Pengaruh 2,4-Diklorofenoksiasetat (2,4-D) dan Benzyl Aminopurin (BAP) Terhadap Pertumbuhan Kalus Daun Binahong (*Anredera cordifolia* L.) serta Analisis Kandungan Flavonoid Total**  
**(The Effect of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D) and Benzyl Aminopurin (BAP) on Callus Growth of Binahong Leaf (*Anredera cordifolia* L.) and Analysis of Total Flavonoid Content**

Lili Sugiyarto\* dan Paramita Cahyaningrum Kuswandi\*\*

\*Jurdik Biologi, FMIPA UNY, 081331946350, lili\_sugiyarto@uny.ac.id

\*\*Jurdik Biologi, FMIPA UNY, 0274-880929, paramita@uny.ac.id

---

**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 perbanyakkan 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 penambahan 2,4-D (konsentrasi 1 dan 2 ppm) mampu menginduksi kalus daun binahong pada hari ke-3 dan ke-5 setelah tanam (hst), kontrol pada hari ke-10 sedangkan perlakuan kombinasi di atas 10 hst. Pada media 2,4-D (1 dan 2 ppm), kalus yang dihasilkan berwarna putih bening, kompak dan berair, media 2,4-D 3 ppm kalusnya berwarna putih dan remah, sedangkan kalus yang terbentuk pada media kombinasi IBA dan BAP berwarna hijau dan kompak. 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 terbentuknya kalus tertinggi pada media 2,4-D 1ppm dan kombinasi 0,5ppm IBA + 0,5 ppm BAP yaitu 100%, sedangkan terendah pada kontrol yaitu 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 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 addition of 2,4-D (1 and 2 ppm) is able to induce callus from Binahong leaves on 3 and 5 days after planting, and also 10 days after planting in the controlled and combination treatment. In the 2,4-D media (1 and 2 pm), the callus produced are white watery and compact, while in the 3 ppm 2,4-D media the callus are white and friable. In the media with a combination of BAP and INA the callus are green and compact. The highest average diameter of the callus after 8 weeks in the 1 ppm 2,4-D media reached 2.07 cm followed by the 2 ppm and 3 ppm 2,4-D media producing a diameter of 1.8 cm. In the combination media (BAP and IBA), the callus diameter is less than 0.3 cm. The highest percentage of callus formed is in the media MS+1 ppm 2,4-D and a combination of MS +0,5ppm IBA+0,5ppm BAP that reached 100%. The lowest is found in the control (MS) which reached only 20%. 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.

Key words : 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 (Suryowinoto, 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 diantaranya 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 kedalam erlemmeyer sebelum dimasukkan ke dalam LAF. Sterilisasi eksplan dilakukan dengan menggunakan alkohol 70%, kemudian dilanjutkan dengan larutan *clorox* 10%. Kemudian 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 antar perlakuan.

Tabel 1. Beberapa konsentrasi ZPT (perlakuan) yang digunakan

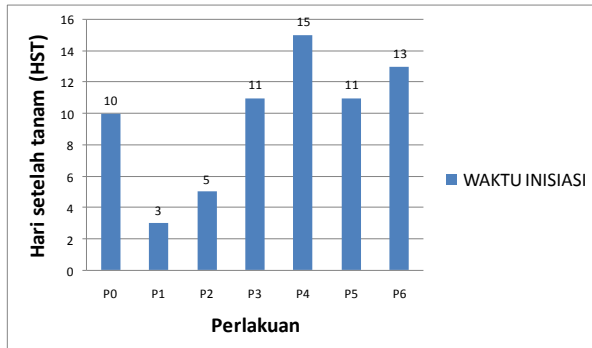
No	Perlakuan	Jumlah eksplan
1	MS	15
2	MS+1 ppm 2,4 D	15
3	MS+2 ppm 2,4 D	15
4	MS+3 ppm 2,4 D	15
5	MS+0,5 ppm IBA+0,5 ppm BAP	15
6	MS+0,5 ppm IBA+1,0 ppm BAP	15
7	MS+1,0 ppm IBA+0,5 ppm BAP	15
Total		105

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 DISKUSI

### A. 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 :

Po : 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

## B. Morfologi kalus (Tipe dan warna)

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

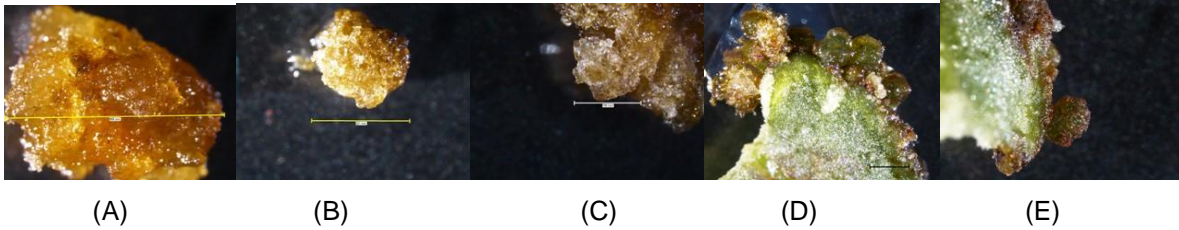
Pada umur 4 minggu setelah tanam, dengan konsentrasi 2,4-D (1 dan 2 ppm), kalus yang terbentuk berwarna putih bening, berair dan kompak, sedangkan pada konsentrasi 3 ppm kalus yang muncul berwarna putih susu dan remah. Berdasarkan tekstur dan komposisi selnya, kalus dapat dibedakan menjadi kalus yang 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,

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.

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 dkk., 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 Ermavitalini, 2013). Pada permukaan bawah kalus juga terlihat jaringan yang berair, hal ini karena

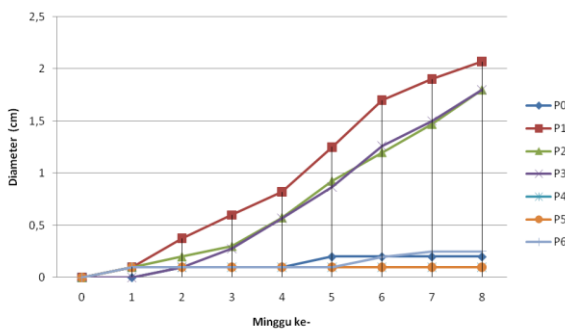
permukaan bawah langsung bersentuhan dengan media dan berperan sebagai area penyerapan media. Foto kalus pada minggu ke-8 dapat di lihat pada gambar 2.



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

### C. Rerata diameter kalus

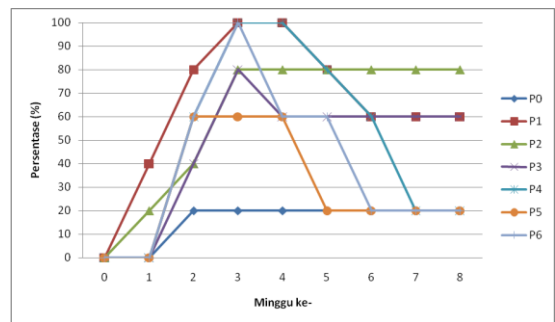
Rerata diameter tertinggi selama 8 minggu pada media 2,4-D 1 ppm mencapai 2,07 cm, diikuti 3 ppm dan 2 ppm sekitar 1,8 cm, sedangkan pada media kombinasi diameter kalus kurang dari 0,3 cm. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa 2,4-D sebagai ZPT tunggal mampu menginduksi kalus daun binahong paling banyak 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

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



Gambar 4. Grafik persentase eksplan yang muncul kalus

### E. Kadar Flavonoid Total

Kadar flavonoid total dari sampel kalus daun binahong bertekstur kompak (2,4-D 2ppm) 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), 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.

Tabel 3. Kadar flavonoid total kalus daun binahong

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

## SIMPULAN

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.

## SARAN

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

## UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan kepada Universitas Negeri Yogyakarta melalui Dana DIPA FMIPA, sehingga penelitian ini dapat dilaksanakan dengan baik.

## PUSTAKA

1. 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
2. Chang CC, Yang MH, Wen HM, Chern JC.2002. Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. *J Food. Drug Anal*.Vol.10.,178-182.
3. Collin, H. A. & S. Edward. 1998. *Plant Cell Culture*. UK: BIOS Scientific Publisher
4. Gunawan, L. W. 1992. *Teknik Kultur Jaringan Tumbuhan*. Bogor: PAU IPB
5. Hendaryono, D. P. S & A. Wijayani. 1994. *Teknik Kultur Jaringan*. Yogyakarta: Kanisius
6. Indah P.N. dan D. Ermavitalini.2013. Induksi Kalus Daun Nyamplung (*Calophyllum inophyllum* Linn.) pada Beberapa Kombinasi Konsentrasi 6-Benzylaminopurine (BAP) dan 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D).*Jurnal Sains dan Seni Pomits*. Vol.2,No.1.,2337-3520.
7. Manoi, F. 2009. "Binahong (*Anredera cordifolia*) sebagai Obat". *Warta Penelitian dan Pengembangan Tanaman Industri*. Vol.15,No. 1., 3-5
8. Pierik, R.M.L. *In Vitro Culture of Higher Plants*. Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht.The Netherlands. 1987.p71.
9. Suryowinata, M.1996. *Pemuliaan Tanaman Secara In vitro*. Kanisius, Yogyakarta
10. Thomas, E dan M. R. Davey. 1975. *From Single Cell to Plant*. London: Wykehan Publisher Ltd.
11. Wardani D.P., Solichatun, dan A.D. Setyawan.2004. Pertumbuhan dan Produksi Saponin Kultur Kalus *Talinum paniculatum* Gaertn. Pada Variasi Penambahan Asam 2,4-Diklorofenoksi Asetat (2,4-D) dan Kinetin. *Biofarmasi*. Vol. 2.NO.1.,35-43.

