

Biofarmasi 1 (1): 1-6, Februari 2003, ISSN: 1693-2242
© 2003 Jurusan Biologi FMIPA UNS Surakarta

Pengaruh Asam 2,4-Diklorofenoksiasetat (2,4-D) terhadap Pembentukan dan Pertumbuhan Kalus serta Kandungan Flavonoid Kultur Kalus *Acalypha indica* L.

The effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) on callus growth and production flavonoid content on culture callus Acalypha indica L.

BEKTI RAHAYU, SOLICHAUN*, ENDANG ANGGARWULAN

Jurusan Biologi FMIPA UNS Surakarta 57126.

* Korespondensi: olich@mipa.uns.ac.id. Tel./Faks. +6271-663375.

Diterima: 19 Oktober 2002. Disetujui: 11 Nopember 2002.

Abstract. The Objectives of the research were to study the effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) on callus initiation and growth, as well as on flavonoid content on *Acalypha indica* callus. The outline of the research was that *Acalypha indica* as a medicinal plant potentially to be developed by *in vitro* culture method. The addition of 2,4-D in culture medium could induce cell proliferation, meanwhile it also affects callus growth and production. Completely randomized design with three replicates was used in this study. Data collected were analyzed using ANOVA and followed by DMRT with 5% confidence level. The research consists of two experiments. *Firstly*, to study the effect of medium Murashige and Skoog's composition on callus production. The media used in this experiment were medium MS and medium MS with 2,4-D 0,5 mg/L and kinetin 0,5 mg/L. *Secondly*, to study the effect of 2,4-D on callus growth with 4 concentrations (0 mg/L, 1 mg/L, 2 mg/L and 3 mg/L). The research variables were initiation time, weight change, texture and color of callus. Chlorophyll content was analyzed spectrophotometrically, but flavonoid content was analyzed using thin layer chromatography (TLC). The research on callus production stage indicated that 0,5 mg/L 2,4-D and 0,5 mg/L kinetin were better than 0 mg/L 2,4-D and 0 mg/L kinetin, and resulted in highest weight change at eight weeks (920 mg). Additional amount of 3 mg/L of 2,4-D resulted in the the best growth of callus indicated by highest addition of weight (10160 mg) at eight weeks. The chlorophyll analysis showed that 0 mg/L 2,4-D produced highest chlorophyll content of 3,74 μ mol. The callus chlorophyll content would lower with rising 2,4-D concentration. The flavonoid analysis using TLC was negative on callus.

Key words: *Acalypha indica* L., 2,4-D, callus culture, callus growth, flavonoid.

PENDAHULUAN

Pemanfaatan tanaman sebagai bahan obat, terutama obat tradisional telah lama dilakukan masyarakat Indonesia. Tanaman *Acalypha indica* termasuk dalam famili Euphorbiaceae merupakan tanaman obat yang potensial dikembangkan. Daunnya yang berkhasiat obat sering digunakan untuk obat pencahar (cuci perut), peluruh batu ginjal, diabetes militus, serta anti biotik (Duryatmo, 2000; Heyne, 1987). Khasiat suatu tanaman berasal dari senyawa kimia yang terdapat di dalamnya. *A. indica* mengandung beberapa senyawa kimia yaitu flavonoid, saponin, tanin, dan minyak atsiri (Hutapea, 1993). Dari beberapa senyawa kimia tersebut, flavonoid diduga mempunyai peranan yang penting sebagai bahan obat. Sejauh ini penelitian mengenai induksi pembentukan dan pertumbuhan kalus serta kandungan flavonoid *A. indica* melalui teknik kultur *in vitro* belum banyak dilakukan.

Pembentukan dan pertumbuhan kalus dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya komposisi media tumbuh. Pertumbuhan dan perkembangan eksplan dipengaruhi oleh komposisi media yang digunakan (Gati dan Mariska, 1992). Media yang biasa digunakan dalam kultur *in vitro* adalah media

Murashige dan Skoog (MS). Media ini mempunyai konsentrasi garam organik yang lebih tinggi dibanding media lain (Husni, 1997). Salah satu komponen yang sering ditambahkan dalam media adalah auksin dan sitokinin. Pemakaian keduanya dalam konsentrasi tepat dapat mengatur arah dan kecepatan pertumbuhan jaringan (Gati dan Mariska, 1992; Indrayanto, 1988).

Dalam kultur *in vitro* tahap pertama yang perlu dilakukan yaitu menginduksi kalus dari eksplan. Pembentukan dan pertumbuhan kalus dapat dipacu dengan pemberian zat pengatur tumbuh, baik auksin maupun dikombinasikan dengan sitokinin. Teknik kultur *in vitro* juga dapat diaplikasikan untuk memproduksi senyawa kimia alami. Keuntungannya antara lain dapat diperoleh hasil secara cepat, seragam, dan tidak membutuhkan lahan yang luas (Indrayanto, 1988). Untuk meningkatkan produksi senyawa kimia pada kalus, maka dapat dilakukan manipulasi terhadap media kultur, misalnya dengan penambahan zat pengatur tumbuh tertentu (Toruan *et al.*, 1990).

Zat pengatur tumbuh auksin yang sering ditambahkan dalam media kultur adalah asam 2,4-diklorofenoksiasetat (2,4-D) (Syahid dan Hernani, 2001). Zat pengatur tumbuh ini bersifat stabil karena tidak mudah mengalami kerusakan oleh

cahaya maupun pemanasan pada waktu sterilisasi (Hendaryono dan Wijayani, 1994). Penambahan 2,4-D dalam media akan merangsang pembelahan dan pembesaran sel pada eksplan sehingga dapat memacu pembentukan dan pertumbuhan kalus serta meningkatkan senyawa kimia alami flavonoid.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober 2001 s.d April 2002, di Sub-Laboratorium Biologi, Laboratorium Pusat MIPA, Universitas Sebelas Maret Surakarta.

Bahan yang diperlukan meliputi bahan tanaman berupa daun *Acalypha indica* L. muda dan bahan kimia yang meliputi akuades, deterjen cair, alkohol absolut, Natrium hipoklorit (NaClO), media dasar Murashige dan Skoog (MS), agar, asam 2,4-diklorofenoksiasetat (2,4-D), kinetin, aseton 80%, amoniak, toluen, etil asetat, dan metanol. Adapun alat-alat yang digunakan meliputi botol kultur, cawan petri, skalpel, pinset, aluminium foil, autoklaf, laminar air flow cabinet (LAFC), magnetic stirrer, lampu bunsen, pH meter, mortar, tabung reaksi, kuvet, spektrofotometer, kertas saring Whatman no. 42, mikro pipet, lempeng silika gel 254, sentrifus, dan vortek.

Penelitian ini meliputi dua kegiatan yang dilakukan secara bertahap, yaitu pembentukan kalus dan penumbuhan kalus. Rancangan penelitian yang digunakan yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL), dengan satu faktor yaitu asam 2,4-diklorofenoksi asetat dengan tiga taraf yang meliputi D₀ (konsentrasi 2,4-D 0 mg/L), D₁ (konsentrasi 2,4-D 1 mg/L, D₂ (konsentrasi 2,4-D 2 mg/L), dan D₃ (konsentrasi 2,4-D 3 mg/L) masing-masing dengan tiga ulangan.

Pelaksanaan penelitian meliputi pembentukan kalus yaitu: daun *A. indica* disterilkan dengan alkohol 5% selama 5-10 detik kemudian direndam dalam kloroks 5% selama 5-10 menit dan dibilas sebanyak tiga kali dengan akuades. Eksplan yang sudah steril dipotong dengan ukuran 1 x 1 cm², kemudian ditanam dalam media pembentukan kalus, dan disimpan dalam rak kultur di ruang inkubasi dengan suhu ± 25°C, selama delapan minggu. Intensitas cahaya yang diberikan sebesar 20 watt selama 24 jam per hari. Penanaman kalus pada media perlakuan yaitu kalus yang diperoleh dipotong ± 500 mg dan ditanam dalam media perlakuan.

Parameter yang diamati pada uji sterilisasi berupa kemungkinan adanya kontaminasi yang diamati secara langsung dengan melihat ciri-ciri umum koloni mikroorganisme. Pada tahap pembentukan kalus parameter yang diamati meliputi saat muncul kalus, tekstur dan warna kalus, serta pertambahan berat basah kalus, sedang pada tahap pertumbuhan kalus parameter yang diamati meliputi berat basah dan berat kering kalus, tekstur dan warna kalus, kandungan klorofil dan kandungan flavonoid.

Analisis data dilakukan dengan menggunakan analisis varian (ANOVA) taraf 5% dan apabila terdapat beda nyata dilanjutkan dengan uji Duncan (DMRT) taraf 5%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sterilisasi eksplan

Dari berbagai metode sterilisasi eksplan yang dilakukan diperoleh sterilan terbaik yaitu alkohol 10% selama 10 detik dan kloroks 5% selama 5 menit (Tabel 1.). Metode sterilisasi terbaik ditandai dengan rendahnya tingkat kontaminasi dan tingginya tingkat kesegaran jaringan. Metode ini digunakan pada perlakuan selanjutnya.

Tabel 1. Uji sterilan pada eksplan daun *A. indica*.

| No | Sterilan | Kesegaran jaringan | Jenis kontaminan |
|----|--|--------------------|-----------------------|
| 1 | Alkohol 50%, 10 detik Kloroks 10%, 10 menit | - | - |
| 2 | Alkohol 25%, 10 detik Kloroks 10%, 10 menit | - | Jamur ++ Bakteri + |
| 3 | Alkohol 10%, 10 detik Kloroks 5%, 10 menit | - | Jamur ++ Bakteri + |
| 4 | Alkohol 10%, 10 detik Kloroks 5%, 5 menit | ++ | - |
| 5 | Alkohol 5%, 5 detik Kloroks 5%, 10 menit | + | Jamur + Bakteri ++ |

Keterangan: Kesegaran jaringan: (-) tidak segar, (+) (kurang segar), ++ (segar). Jumlah kontaminan: (++) sedang, (+) sedikit, (-) tidak ada.

Induksi pembentukan kalus

Pemunculan kalus

Hasil pengamatan terhadap saat muncul kalus dari eksplan yang ditanam pada media A dan media B disajikan pada Tabel 2. Dari hasil sidik ragam, antara media A dan media B terdapat beda nyata untuk saat muncul kalus. Kalus muncul pada permukaan eksplan dan dari luka irisan secara serentak, ditandai dengan membengkaknya eksplan dan munculnya bintik-bintik putih. Pada media A kalus muncul 14,33 hari setelah dikulturkan. Pada media B kalus muncul lebih cepat yaitu 8,33 hari setelah dikulturkan. Asam 2,4-diklorofenoksiasetat (2,4-D) pada konsentrasi 0,5 mg/L dan kinetin 0,5 mg/L mampu merangsang pembelahan sel daun dan melakukan proses dediferensiasi untuk membentuk kalus lebih cepat. Hal ini sesuai dengan yang dikemukakan oleh Gati dan Mariska (1992), 2,4-D efektif untuk memacu pembentukan kalus karena aktivitasnya yang kuat untuk memacu proses dediferensiasi sel, menekan organogenesis serta menjaga pertumbuhan kalus. Hasil penelitian menunjukkan bahwa keberadaan kinetin pada konsentrasi 0,5 mg/L dalam media mendukung pembentukan kalus. Hal ini didukung pendapat Dixon dalam Setiti dkk, (1996) yang mengemukakan bahwa media dengan penambahan sitokinin akan menaikkan proliferasi kalus.

Tabel 2. Saat muncul kalus dan pertambahan berat basah kalus *A. indica* pada media induksi pembentukan kalus.

| Media | Rerata muncul kalus (hari) | Pertambahan berat basah kalus (mg) |
|--|----------------------------|------------------------------------|
| Media A: MS dasar tanpa penambahan auksin dan kinetin | 14,33 ^a | 220 ^a |
| Media B: MS dasar dengan penambahan 2,4-D 0,5 mg/L dan kinetin 0,5 mg/L | 8,33 ^b | 920 ^b |

Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang sama pada satu baris tidak berbeda nyata dengan DMRT taraf 5%.

Pada media A, meskipun tanpa penambahan zat pengatur tumbuh eksplan mampu membentuk kalus. Kalus yang muncul diduga disebabkan jaringan yang dikultur mempunyai auksin endogen yang cukup untuk membentuk kalus, meskipun tanpa penambahan auksin dari luar, selain itu juga disebabkan jaringan mempunyai kambium. Hal ini sesuai dengan pendapat Gunawan dalam Zulkarnain dan Hadiyono (1997) yang mengemukakan bahwa salah satu faktor penentu pada inisiasi kalus adalah ada atau tidaknya kambium pada eksplan. Bila eksplan mengandung kambium maka kalus dapat terbentuk.

Dari media A dan media B, munculnya kalus secara cepat ini diduga karena daun *A. indica* tipis dan tidak memiliki lapisan lilin, sehingga memudahkan eksplan untuk menyerap unsur hara dari media. Kalus merupakan proliferasi massa jaringan yang belum terdiferensiasi, sehingga semakin luas permukaan irisan eksplan maka kalus yang terbentuk semakin banyak dan cepat (Hendaryono dan Wijayani, 1994).

Pertambahan berat basah kalus

Pertambahan berat basah kalus pada media A dan media B disajikan pada Tabel 2. di atas. Pada media A pertambahan berat kalus yaitu 220 mg, sedang pada media B lebih tinggi yaitu 920 mg. Dari hasil pengamatan saat muncul kalus dan pertambahan berat basah kalus, diketahui bahwa media MS dengan penambahan zat pengatur tumbuh 2,4-D 0,5 mg/L dan kinetin 0,5 mg/L lebih baik dari pada media MS tanpa penambahan ZPT untuk memacu pembentukan kalus. Dari hasil ini, maka media B dipilih sebagai media dasar pada perlakuan selanjutnya.

Tekstur dan warna kalus

Warna kalus yang dihasilkan dari media pembentukan kalus (media A dan media B) yaitu putih dan hijau. Kalus muda berwarna putih, kemudian warnanya akan berubah menjadi hijau dengan bertambahnya umur. Perbedaan warna kalus ini disebabkan adanya perubahan pigmentasi (Harjoko, 1999).

Kalus yang dihasilkan pada media A bertekstur agak remah pada bagian atas, sedang bagian bawahnya bertekstur kompak. Demikian pula pada media B, kalus bertekstur remah pada bagian atas

dan bagian bawahnya bertekstur kompak (Tabel 3.). Kalus yang remah dapat diperoleh dengan cara melakukan sub kultur berulang-ulang dengan media padat. Pembentukan kalus dipengaruhi oleh zat-zat tertentu dalam media seperti zat pengatur tumbuh. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Torrey dan Shigemura dalam Street (1972) pada tanaman *Pea* bahwa konsentrasi 2,4-D dan ekstrak khamir yang tinggi akan menghasilkan kalus bertekstur remah (*friable*).

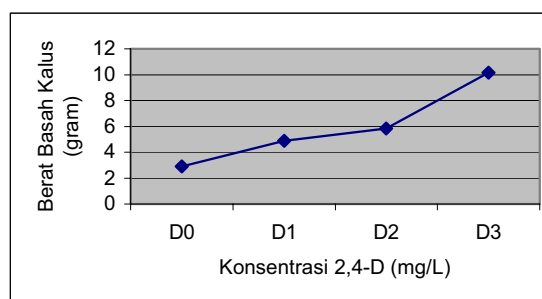
Tabel 3. Tekstur dan warna kalus *A. indica* pada media induksi pembentukan kalus.

| Media | Tekstur dan warna kalus |
|--|--|
| Media A: MS dasar tanpa penambahan auksin dan kinetin | Agak remah (atas), kompak (bawah), hijau muda, putih |
| Media B: MS dasar dengan penambahan 2,4-D 0,5 mg/L dan kinetin 0,5 mg/L | Remah (atas), kompak (bawah), hijau muda, putih |

Pertumbuhan kalus

Berat basah kalus

Data hasil pengamatan berat basah kalus dan hasil analisis sidik ragam berat basah kalus disajikan pada Tabel 4. Dari Tabel ini dapat diketahui bahwa penambahan 2,4-D pada masing-masing konsentrasi menyebabkan terjadinya beda nyata terhadap berat basah kalus *A. indica* pada masing-masing perlakuan. Dari rata-rata berat basah setiap perlakuan, perlakuan D₃ memberikan nilai tertinggi diantara perlakuan yang lain yaitu 10160 mg, sedangkan perlakuan D₀ mempunyai nilai rata-rata terendah yaitu 2900 mg. Semakin tinggi konsentrasi 2,4-D yang digunakan, maka semakin meningkat berat basah kalus (Gambar 1.). Berat basah kalus yang besar ini disebabkan karena kandungan airnya yang tinggi. Berat basah yang dihasilkan sangat tergantung pada kecepatan sel-sel tersebut membelah diri, memperbanyak diri dan dilanjutkan dengan membesarnya kalus.

**Gambar 1.** Hubungan konsentrasi 2,4-D terhadap berat basah pada kalus *A. indica*.

Zat pengatur tumbuh auksin dan sitokinin yang diberikan pada perbandingan yang tepat dapat menginisiasi pembelahan sel dan meningkatkan pertumbuhan sel. Hal ini terjadi pada perlakuan D₃.

Pengaruh auksin terhadap pertumbuhan jaringan diduga menginduksi sekresi ion H^+ keluar melalui dinding sel. Pengasaman dinding sel menyebabkan K^+ diambil, pengambilan ini mengurangi potensial air dalam sel; akibatnya air mudah masuk ke dalam sel dan sel akan membesar (Harjoko, 1999; Maftuchah dkk, 1998).

Pada perlakuan D_0 (kombinasi 2,4-D 0,5 mg/l + kinetin 0,5 mg/l) rata-rata berat basah yang diperoleh paling rendah yaitu 2900 mg. Hal ini menunjukkan bahwa kombinasi kedua ZPT pada taraf konsentrasi tersebut kurang tepat untuk pertumbuhan kalus. Kecepatan sel membelah diri dipengaruhi oleh kombinasi auksin dan sitokinin dalam konsentrasi tertentu, selain itu juga tergantung pada jenis tumbuhan faktor-faktor lain seperti jenis media, ketersediaan unsur hara makro/mikro, karbohidrat, adanya bahan tambahan seperti air kelapa dan juga faktor-faktor fisik seperti cahaya, pengocokan, suhu, dan pH media (Gunawan, 1991).

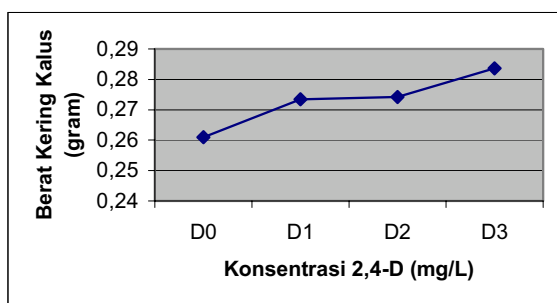
Berat kering kalus

Selain didasarkan pada berat basah, pertumbuhan kalus juga didasarkan pada berat keringnya. Dari hasil sidik ragam dapat diketahui bahwa pemberian ZPT auksin 2,4-D berpengaruh tidak nyata terhadap berat kering kalus. Dari rata-rata berat kering kalus maka penambahan 2,4-D 3 mg/L menunjukkan berat kering yang paling tinggi yaitu 280 mg. Pada konsentrasi 0 mg/L 2,4-D berat keringnya paling rendah yaitu 260 mg. Semakin tinggi konsentrasi 2,4-D, maka berat kering kalus semakin tinggi. Rata-rata berat kering kalus 8 minggu setelah tanam disajikan pada Tabel 4.

Tabel 4. Rata-rata berat basah dan berat kering kalus *A. indica* 8 minggu setelah tanam (mg).

| Perlakuan | D_0 | D_1 | D_2 | D_3 |
|--------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
| Berat Basah | 2900 ^a | 4880 ^a | 5850 ^a | 10160 ^b |
| Berat Kering | 260 ^a | 270 ^a | 270 ^a | 280 ^a |

Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang sama dalam satu baris tidak berbeda nyata dengan DMRT taraf 5%. D_0 : konsentrasi 2,4-D 0 mg/L, D_1 : konsentrasi 2,4-D 1mg/L, D_2 : konsentrasi 2,4-D D_3 : konsentrasi 2,4-D 3 mg/L yang ditambahkan dalam media kultur.



Gambar 2. Grafik hubungan konsentrasi 2,4-D terhadap berat kering pada kalus *A. indica*.

Dari Gambar 2 dapat diketahui peningkatan berat kering kalus. Peningkatan ini disebabkan meningkatnya aktivitas kalus pada masing-masing perlakuan. Di dalam sel, 2,4-D diduga mempengaruhi metabolisme RNA, yang mengontrol metabolisme protein, yang kemungkinan dilakukan pada proses transkripsi molekul RNA (Maftuchah dkk, 1998). Kenaikan sintesis protein menyebabkan bertambahnya sumber tenaga untuk pertumbuhan.

Penggunaan auksin 2,4-D dapat memacu pertumbuhan kalus. Hal ini ditunjukkan dengan terjadinya pertambahan ukuran dan berat kering kalus yang tidak dapat balik. Pertumbuhan berkaitan dengan pertambahan volume dan jumlah sel, pembentukan protoplasma baru, pertambahan berat dan selanjutnya meningkatkan berat keringnya. Bahan kering ini terdiri dari bahan-bahan organik dan mineral yang penting untuk pertumbuhan kalus.

Kandungan klorofil dan karotenoid kalus

Pengukuran kandungan klorofil dan karotenoid dilakukan setelah panen. Kandungan klorofil yang diukur ialah kandungan klorofil a, klorofil b dan klorofil total. Hasil analisis sidik ragam kandungan klorofil a, klorofil b, klorofil total dan karotenoid kalus *A. indica* menunjukkan bahwa perlakuan yang diberikan berpengaruh nyata (Tabel 5.).

Tabel 5. Rata-rata kandungan klorofil a, klorofil b, klorofil total dan karotenoid kalus *A. indica*. (μmol)

| Kandungan | Perlakuan | | | |
|----------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | D_0 | D_1 | D_2 | D_3 |
| Klorofil a | 1,49 ^a | 1,39 ^b | 0,60 ^c | 0,28 ^d |
| Klorofil b | 2,24 ^a | 2,15 ^b | 1,80 ^c | 0,28 ^c |
| Klorofil Total | 3,74 ^a | 3,54 ^b | 2,46 ^c | 1,97 ^d |
| Karotenoid | 3,37 ^a | 2,73 ^b | 2,18 ^c | 1,60 ^d |

Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang sama pada satu baris, tidak berbeda nyata dengan DMRT 5%.

Dari Tabel 5. diketahui bahwa kandungan klorofil a pada setiap perlakuan menunjukkan perbedaan dengan kontrol (D_0) dan terjadi penurunan yang besar dengan bertambahnya 2,4-D yang digunakan. Penurunan kandungan klorofil a berpengaruh terhadap penurunan kandungan klorofil b dan klorofil total. Klorofil a merupakan pigmen yang mampu mengkatalisis fotosintesis secara langsung. Klorofil a berperan dalam reaksi konversi energi radiasi menjadi energi kimia. Pigmen-pigmen lain seperti klorofil b dan karotenoid juga menyerap cahaya tetapi energi yang diserap ditransfer ke klorofil a kemudian baru digunakan

Hasil analisis sidik ragam menunjukkan bahwa penambahan 2,4-D dalam media, pada semua konsentrasi yang berbeda berpengaruh nyata terhadap kandungan klorofil total (Tabel 5.). Secara visual hal ini juga dapat dibedakan dari warnanya, dengan meningkatnya konsentrasi auksin warna kalus semakin menguning. Hal ini berkaitan dengan berkurangnya pigmen klorofil pada kalus.

Dari Tabel 5. rata-rata pada setiap perlakuan menunjukkan bahwa kandungan klorofil tertinggi diperoleh pada perlakuan D₀ yaitu 3,74 µmol, sedang nilai terendah pada perlakuan D₃ yaitu 1,97 µmol. Semakin tinggi konsentrasi 2,4-D yang ditambahkan dalam media mempengaruhi penurunan kandungan klorofil dan karotenoid. Beberapa penelitian menyebutkan bahwa kenaikan kadar auksin akan menurunkan kandungan klorofil (Kismonohadi, 1989). Penurunan kandungan klorofil ini diduga terjadi karena pengaruh auksin pada metabolisme karbohidrat. Audus (1963) mengemukakan bahwa penggunaan 2,4-D pada tanaman dapat mengganggu metabolisme karbohidrat. Sintesis klorofil dipengaruhi oleh karbohidrat yang merupakan zat pokoknya (Miller, 1959). Apabila metabolisme karbohidrat terganggu maka sintesis klorofil juga akan terganggu. Penurunan kandungan klorofil juga diikuti dengan penurunan karotenoid pada kalus.

Tekstur dan warna kalus pada media

Tekstur kalus *A. indica* pada media perlakuan menunjukkan hasil yang sama dengan media pembentukan kalus, yaitu kalus bersifat remah. Adapun warna kalus yang dihasilkan disajikan pada Tabel 6.

Tabel 6. Tekstur dan warna kalus *A. indica* 8 minggu setelah tanam pada media perlakuan.

| Perla- kuan | Tekstur kalus | | Warna kalus | |
|----------------|---------------|-------|-----------------|--|
| | Awal | Akhir | Awal | Akhir |
| D0 | Remah | Remah | Hijau, putih | Hijau, putih, kuning, putih kekuningan, kuning |
| D1 | Remah | Remah | Hijau, putih | Hijau, putih, kuning |
| D2 | Remah | Remah | Hijau, putih | Hijau, putih, kuning |
| D3 | Remah | Remah | Hijau, putih | Putih, putih kekuningan, kuning, kuning- kecoklatan, coklat |

Meningkatnya konsentrasi 2,4-D yang ditambahkan dalam media mengakibatkan warna kalus cenderung menguning. Hal ini tampak pada perlakuan D₃ dengan konsentrasi 2,4-D 3 mg/L, warna kalus yang dihasilkan yaitu putih, putih kekuningan, kuning, kuning kecoklatan dan coklat. Perubahan ini diduga karena adanya perubahan pigmentasi pada kalus yaitu berkurangnya pigmen hijau (klorofil). Pada perlakuan D₃ ini kalus menampilkan adanya pencoklatan. Hal ini diduga karena kalus terlalu lama berada dalam media kultur dan tidak segera disubkultur, sehingga kalus kehabisan nutrisi pada medianya untuk pertumbuhan.

Analisis kandungan flavonoid kalus *A. indica*

Analisis kandungan flavonoid pada kalus *A. indica* dengan kromatografi lapis tipis (KLT) menunjukkan tidak adanya flavonoid, karena bercak warna kuning sebagai indikator adanya flavonoid tidak tampak pada *plate*, kecuali pada totalan ekstrak daun yang digunakan sebagai pembanding. Hal ini menunjukkan bahwa hasilnya negatif atau tidak ditemukan senyawa flavonoid (Tabel 7).

Tabel 7. Hasil analisis kandungan flavonoid kalus *A. indica* dengan kromatografi lapis tipis (KLT).

| Perlakuan | Flavonoid |
|----------------|-----------|
| D ₀ | - |
| D ₁ | - |
| D ₂ | - |
| D ₃ | - |
| Ekstrak daun | + |

Keterangan: (-): tidak mengandung flavonoid (+): mengandung flavonoid.

Dari semua konsentrasi asam 2,4-diklorofenoksiasetat yang digunakan pada media ternyata tidak berpengaruh terhadap kandungan senyawa flavonoid. Hal ini diduga 2,4-D yang ditambahkan dalam media seluruhnya digunakan untuk meningkatkan pembentukan dan pertumbuhan ukuran kalus, sehingga untuk pembentukan flavonoid berkurang atau tidak ada. Dalam sintesis flavonoid auksin berfungsi untuk meningkatkan kerja enzim fenilalanin amonia liase (PAL) yang menghasilkan sinamat dari fenilalanin. Jalur berikutnya yaitu pembentukan flavonoid dari malonil Co-A, apabila auksin berkurang maka pembentukan flavonoid juga berkurang. Robbins *et al.*, (1992) mengemukakan bahwa untuk menghasilkan senyawa fenol secara *in vitro* selain diperlukan penambahan zat pengatur tumbuh, juga perlu ditambahkan unsur lain seperti kasein hidrolisis, asam amino, dan NH₄NO₃ untuk membantu pertumbuhan kalus dan produksi senyawa kimia. Dalam kultur kalus *Liquidambar styraciflua* penambahan unsur-unsur tersebut efektif untuk pertumbuhan dan meningkatkan kandungan fenolnya.

KESIMPULAN

Penambahan 2,4-D 0,5 mg/L dan kinetin 0,5 mg/L pada media Murashige dan Skoog (MS) dapat memacu pembentukan kalus *Acalypha indica*, dan penambahan 3 mg/L 2,4-D efektif untuk memacu pertumbuhan kalus *Acalypha indica*, ditandai dengan kenaikan berat basahanya yaitu 10.160 gram dan berat kering 280 gram. Penambahan 2,4-D dengan konsentrasi 1 mg/L, 2 mg/L dan 3 mg/L pada media kultur kalus *Acalypha indica* belum mempengaruhi kandungan flavonoidnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Audus, L.J. 1963. *Plant Growth Substances*. New York: CRC Press, Inc.
- Duryatmo, S. 2000. Anting-anting lawan tanding sakit gula. *Trubus* 31 (373): 51-52.
- Gati, E dan I. Mariska. 1992. Pengaruh auksin dan sitokinin terhadap kalus **Mentha piperita** Linn. *Buletin Littri* 3: 1-4.
- Gunawan, L.W. 1991. *Bioteknologi Tanaman*. Bogor: PAU Bioteknologi IPB.
- Harjoko, D. 1999. *Pengaruh Macam-macam Auksin terhadap Poliploidisasi Kalus Tanaman Semangka pada Kultur in Vitro*. Surakarta: Fakultas Pertanian UNS.
- Hendaryono, D.P dan A. Wijayani. 1994. *Teknik Kultur Jaringan*. Yogyakarta: Kanisius.
- Heyne, K. 1987. *Tumbuhan Berguna Indonesia* Jilid II. Jakarta: Departemen Kehutanan.
- Husni, A. 1997. Perbanyakan dan penyimpanan tanaman Inggu melalui kultur jaringan. *Plasma Nutfah* 11 (1): 9-23.
- Hutapea, J.R. 1993. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia* (II). Jakarta: Departemen Kesehatan RI.
- Indrayanto, G. 1988. *Kultur Jaringan Tanaman, Suatu Petunjuk Praktik untuk Bidang Farmasi*. Yogyakarta: PAU Bioteknologi UGM.
- Kismonohadi. 1989. *Pedoman Kuliah Biosintesis Alkaloid*. Yogyakarta: PAU Bioteknologi UGM.
- Maftuchah, Ardiana, H.K dan Joko, B.S. 1998. Induksi kalus **Artemisia (Artemisia vulgaris L.)** melalui kultur *in vitro*. *Tropika* 6 (2): 135-141.
- Miller, E.C. 1938. *Plant Physiology*. Second Edition. New York: Mc. Graw Hill Book Company, Inc.
- Robbins, M.P., T.R. Carron and P.Morris. 1992. Transgenic **Lotus corniculatus**: a model system or modification and genetic manipulation of condensed tannin biosynthesis. In Hemingway, R.W. and P.E. Laks. (ed.) *Plant Polyphenols*. New York: Plenum Press.
- Setiti, E.W.U., Sri Puji A.W. dan T. Sudarti. 1996. Peranan media dan ZPT untuk induksi dan diferensiasi kalus pada budidaya jaringan melon. *Jurnal Hortikultura* 5 (5): 76-79.
- Street, H.E. 1972. *Plant Tissue and Cell Culture*. London: Blackwell Scientific.
- Syahid, S.F. dan Hernani. 2001. Pengaruh zat pengatur tumbuh terhadap pembentukan dan pertumbuhan serta kandungan sinensetin dalam kalus pada tanaman kumis kucing (**Orthosiphon aristatus**). *Jurnal Littri* 4: 99-103.
- Toruan, N.S., Solahudin, L. Winata, D. Sastra-pradja, dan K. Padmawinata. 1990. Pengaruh 2,4-D, kolesterol dan radiasi Co-60 terhadap pertumbuhan dan kandungan diosgenin dalam kultur jaringan **Costus spesiosus**. *Forum Pasca Sarjana* 13 (1): 1-14.
- Zulkarnain dan Hadiyono. 1997. Mikropropagasi tanaman nenas (**Ananas comosus L. Merr.**) menggunakan tunas aksilar mahkota bunga sebagai material awal. *Buletin Agronomi Universitas Jambi* 1 (2): 65-69.