

Efek Kombinasi 2,4 D Dan Kinetin Pada Pembentukan Kalus Daun *Catharanthus roseus* (L.) G. Don Serta Deteksi Alkaloidnya

Effects of Combination of 2,4 D and Kinetin on Callus Formation of Catharanthus roseus (L.) G. Don Leaves and Detection of Alkaloid Content

Siti Khoiriyah¹, Djoko Santosa^{2,3}, Indah Purwantini^{2,3*}

¹ Magister Ilmu Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada

² Departemen Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada

³ Pusat Riset Tumbuhan Obat Dan Bahan Alam, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada

Corresponding author: Indah Purwantini : Email: indahp@ugm.ac.id

Submitted: 26-02-2023

Revised: 13-03-2023

Accepted: 13-03-2023

ABSTRAK

Catharanthus roseus (L.) G. Don dikenal dengan tapak dara merupakan tanaman obat tradisional, yang telah dibudidayakan sebagai tanaman penghasil senyawa alkaloid vinkristin dan vinblastin sebagai antikanker. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh kombinasi 2,4 D dan kinetin terhadap keberhasilan pembentukan dan pertumbuhan kalus serta mengetahui adanya kandungan senyawa alkaloid pada kalus. Eksplan diinokulasi dalam media Murashige-Skoog (MS) padat yang ditambahkan 2,4 D 1 mg/L dan kinetin 4 mg/L untuk menghasilkan kalus, kemudian kalus disubkultur dan dipanen setelah berumur 21 hari. Kalus dimaserasi dengan etanol p.a. Identifikasi senyawa dilakukan menggunakan KLT dengan fase diam silika gel 60 F254 dan fase gerak berupa kloroform:metanol (9:1). Bercak pada pelat KLT dideteksi dengan sinar UV 254 dan 366 nm serta pereaksi Dragendorff. Hasil penelitian menunjukkan kombinasi 2,4 D 1 mg/L dan kinetin 4 mg/L berpengaruh dalam memacu keberhasilan pembentukan dan pertumbuhan kalus dengan rata-rata berat basah dan berat kering kalus masing-masing sebesar 2,359 dan 0,249 gram. Hasil identifikasi senyawa menunjukkan bahwa pada kalus dan tanaman asal mengandung alkaloid yang kemungkinan sama, yaitu senyawa dengan nilai R_f 0,89 dan 0,86.

Kata kunci: *Catharanthus roseus* (L.) G. Don; 2,4 D; kinetin; kalus; alkaloid

ABSTRACT

Catharanthus roseus (L.) G. Don known as tapak dara is a traditional medicinal plant, which has been cultivated as a plant producing vincristine and vinblastine alkaloid compounds as anticancer agents. This study aimed to determine the effect of the combination of 2,4 D and kinetin on the callus formation and growth and to determine the presence of alkaloid compounds in the callus. The explants were inoculated in solid Murashige-Skoog (MS) medium added with 2.4 D 1 mg/L and 4 mg/L kinetin and were incubated until the callus formed. The callus then were subcultured and harvested after 21 days old. Callus was macerated with ethanol pa. The alkaloid compounds were identified using TLC with silica gel 60 F254 as the stationary phase and chloroform: methanol (9:1) as mobile phase. Spots on the TLC plates were detected with 254 and 366 nm UV light and Dragendorff reagent. The results showed that the combination of 2.4 D 1 mg/L and kinetin 4 mg/L affected promoting the formation and growth of callus with an average wet weight and dry weight 2.359 and 0.249 grams respectively. The alkaloid of the callus was predicted of the same compound as in the plants source since the R_f values of 0.89 and 0.86.

Keywords: *Catharanthus roseus* (L.) G. Don; 2,4 D; kinetin; callus; alkaloids

PENDAHULUAN

Catharanthus roseus (L.) G. Don dikenal dengan tapak dara famili Apocynaceae telah digunakan sebagai obat tradisional untuk diabetes di Natal, Afrika Selatan, India dan Ceylon. Air perasan daunnya digunakan sebagai obat sengatan tawon (George dan Eapen, 1999). Tapak dara banyak dibudidayakan sebagai tanaman hias. Dan saat ini tapak dara juga dibudidayakan sebagai tanaman penghasil senyawa alkaloid yang bermanfaat untuk pengobatan, diantaranya adalah vinkristin dan vinblastin sebagai antikanker (Lombonbitung dkk., 2015).

Menurut Shukla dkk. (2006), meskipun daun tapak dara mudah dibudidayakan dengan populasi yang tinggi tetapi tingkat produksi vinblastin dan vinkristin dalam daun tapak dara sangat rendah, yaitu sekitar 0,0003% dari total kandungan alkaloid 2,56%. Dengan demikian perlu dicari metode untuk meningkatkan produksi metabolit sekunder tersebut melalui kultur *in vitro*. Salah satu metodenya dengan menggunakan kultur kalus (Darsini, 2011; Namdeo, 2007). Metabolit yang dihasilkan dari kalus sering kali kadarnya lebih tinggi dibanding metabolit yang diambil langsung dari tanamannya. Salah satu cara yang dapat dilakukan untuk meningkatkan pertumbuhan kalus adalah dengan menambahkan suatu zat atau hormon ke dalam media kultur (Sitorus dkk., 2011).

Hormon pertumbuhan yang paling umum digunakan dalam metode kultur jaringan yaitu golongan auksin dan sitokinin. Auksin berfungsi dalam merangsang kalus atau proliferasi sel dan menginduksi embriogenesis somatik, sedangkan sitokinin berperan dalam pengaturan pembelahan sel serta morfogenesis (Phillips dan Garda, 2019). Salah satu golongan auksin yang sering digunakan dan sangat efektif adalah 2,4 D (*Dichlorophenoxyacetic acid*) yang dapat merangsang pembentukan sel-sel (Mahadi, 2012). Zat pengatur tumbuh sitokinin yang digunakan adalah kinetin yang merupakan sitokinin sintetik yang mempunyai aktivitas yang lebih tinggi dari pada sitokinin alami (Santosa dan Nursandi, 2003). Kinetin dapat merangsang pertumbuhan percabangan tunas adventif yang merupakan perkembangan organ seperti tunas yang berasal dari suatu titik tumbuh (Nurhidayah dkk., 2017). Kombinasi kedua zat pengatur tumbuh tersebut mampu mempercepat pembentukan kalus (Karimi, 2014). Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh kombinasi 2,4 D dan kinetin terhadap keberhasilan pembentukan dan pertumbuhan kalus dan untuk mengetahui adanya kandungan senyawa alkaloid pada kalus daun tapak dara dengan membandingkan dengan tanaman aslinya.

METODE

Bahan

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun *Catharanthus rosesus* (L.) G. Don. atau tapak dara yang diperoleh dari daerah Sleman yang berbunga merah. Bagian tanaman yang digunakan adalah daun pada urutan 2-4 dari ujung tanaman tapak dara. Bahan-bahan yang digunakan adalah etanol p.a, kloroform dan metanol, media Murashige-Skoog, Agar Bacteriological (Agargellan), sukrosa, myo-inositol, sumber besi, natrium hipoklorit, zat pengatur tumbuh (2,4 D dan kinetin), etanol 70%, kertas saring, dan *aluminium foil*.

Alat

Peralatan yang digunakan antara lain seperangkat alat gelas, autoklaf, *laminar air flow* (LAF), pinset, mata pisau dan gagang pisau, cawan petri, botol kultur, seperangkat peralatan untuk kromatografi lapis tipis (KLT).

Cara Kerja

Pembuatan media Murashige-Skoog (MS) padat

Ditimbang Murashige-Skoog (MS) 4,4 gram, sukrosa 30 gram, myo-inositol 100 mg dan agarose 5 gram yang dilarutkan dalam akuades 1 L, kemudian ditambahkan Fe EDTA 5 mg/L dan zat pengatur tumbuh (2,4 D 1 mg/L+kinetin 4 mg/L) untuk penumbuhan kalus. Media ditetapkan pHnya 5-6 kemudian dididihkan sampai jernih. Media dibagi ke dalam 100 botol kultur dan tutup rapat dengan *aluminium foil*. Media disterilisasi dalam autoklaf selama 20 menit dengan tekanan 1,5 atm dan suhu 121°C.

Sterilisasi eksplan

Daun tapak dara dicuci dengan air mengalir dan sabun cair, direndam selama 10 menit kemudian airnya dibuang. Daun kemudian direndam dengan akuades tidak steril dan sabun cair selama 15 dan 20 menit, kemudian airnya dibuang. Daun direndam dengan alkohol 70% selama 1 menit. Daun disterilkan dengan natrium hipoklorit 20% dalam akuades steril 80 ml selama 50 menit kemudian dibilas sebanyak 3 kali dengan akuades steril untuk menghilangkan sisa sterilan.

Induksi dan subkultur kalus

Di dalam cawan petri, daun tapak dara dipotong-potong menjadi bagian yang lebih kecil (eksplan) dengan ukuran panjang 2 cm. Potongan daun ditanam di dalam botol kultur yang berisi media MS padat. Kalus diinkubasi selama 21 hari pada suhu 25° C disinari lampu TL 40 W selama 16 jam/hari. Subkultur dilakukan dengan memindah kalus sebanyak 250 mg pada media MS padat dengan penambahan zat pengatur tumbuh 2,4D sebanyak 1 mg/L dan kinetin sebanyak 4 mg/L. Subkultur diinkubasi selama 21 hari, kalus dipanen dan dilakukan kuantifikasi dengan cara menimbang berat basah dan berat kering kalus.

Identifikasi alkaloid menggunakan Kromatografi Lapis Tipis

Persiapan sampel

Kalus basah dikeringkan dalam lemari pengering pada suhu 40° C selama 24 jam. Kalus kering sebanyak 500 mg dihaluskan dengan baik dalam mortar. Kalus kering dimaserasi dengan 5 ml etanol p.a selama 24 jam, selanjutnya disaring dan hasil maserasi dipekatkan dengan menguapkan di atas penangas air. Ekstraksi yang sama juga dilakukan pada daun tapak dara.

Analisis dengan metode KLT

Analisis dilakukan dengan metode kromatografi lapis tipis dengan cara ekstrak ditotolkan pada lempeng silika gel 60 F254 dengan menggunakan fase gerak kloroform:metanol (9:1). Bercak diamati dengan sinar UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm dan pereaksi penampak bercak Dragendorff. Bercak pada plat KLT kemudian dihitung nilai *R_f*.

Analisis Data

Data pembentukan dan pertumbuhan kalus berupa warna, tekstur kalus, saat muncul kalus, bobot basah dan bobot kering kalus serta profil kromatogram kultur kalus daun tapak dara dianalisis secara deskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Optimasi Sterilisasi Eksplan Dalam Pembentukan Kalus

Teknik sterilisasi merupakan salah satu tahapan yang menentukan keberhasilan dalam melakukan kultur *in vitro*. Sterilisasi ini bertujuan untuk menciptakan kondisi yang steril dari mikroorganisme (Sugiri, 2005). Selain media, alat dan ruangan yang steril, diperlukan juga sterilisasi pada eksplan. Sterilisasi eksplan ini merupakan salah satu proses yang sangat penting agar inisiasi kultur bebas dari kontaminan yang dapat menghambat pertumbuhan eksplan. Sterilisasi eksplan dilakukan dengan mencuci bersih eksplan daun, perendaman dengan sabun cair dan alkohol serta perendaman menggunakan natrium hipoklorit.

Keberhasilan sterilisasi dalam membentuk kalus dipengaruhi oleh pemilihan eksplan yang tepat. Umur tanaman yang digunakan bisa mempengaruhi pembentukan kalus. Eksplan yang digunakan merupakan jaringan tanaman yang masih muda tapi tidak terlalu muda. Jika jaringan yang digunakan terlalu muda akan terjadi kegagalan pembentukan kalus karena terjadi kerusakan jaringan eksplan saat dilakukan pensterilan dengan alkohol 70 % dan natrium hipoklorit. Menurut penelitian Samsumaharto dkk. (2010), jika daun yang diambil terlalu tua maka proses pembelahan lambat karena aktifitas metabolisme yang rendah sehingga zat pengatur tumbuh perlu ditambahkan untuk memenuhi kebutuhan sel tersebut. Daun yang terlalu tua juga sering menyebabkan kontaminasi pada pembentukan eksplan. Pada penelitian ini, eksplan yang digunakan yaitu bagian daun pada urutan 2-4 dari ujung tanaman dengan umur tanaman yang belum berbunga.

Berdasarkan Tabel I dapat dilihat bahwa dari enam kali sterilisasi pada penanaman eksplan untuk membentuk kalus, pada waktu 50 menit adalah waktu yang efektif dalam menanam eksplan untuk menghasilkan kalus dengan tingkat keberhasilan 100 %. Optimasi waktu sterilisasi yang dilakukan oleh Sartika dan Santosa (2012) menunjukkan untuk pembentukan kalus pada daun mahkota dewa dengan waktu sterilisasi 20, 25, 30 dan 35 menggunakan natrium hipoklorit, pada waktu 30 menit adalah waktu yang efektif dalam menanam eksplan dengan tingkat keberhasilan 93,33%.



Gambar 1. Jamur kontaminan pada eksplan daun tapak dara



Gambar 2. Jaringan rusak pada eksplan daun tapak dara

Tabel I. Hasil Optimasi Sterilisasi Eksplan Daun Tapak Dara

Jenis Sterilan	Waktu Sterilisasi (Menit)	Pengamatan Eksplan	Persentase Keberhasilan Pembentukan Kalus (%)
Natrium hipoklorit 20 %	30	Kontaminasi	0
	35	Kontaminasi	0
	40	Kontaminasi	0
	45	Kontaminasi	0
	50	Terbentuk kalus	100
	55	Jaringan eksplan rusak, terbentuk kalus	30
	60	Jaringan eksplan rusak	0

Pada penelitian ini, lama tidaknya waktu sterilisasi tidak menjamin keberhasilan dalam sterilisasi eksplan untuk membentuk kalus. Dimana terlihat pada penanaman eksplan dengan waktu sterilisasi 30, 35, 40 dan 45 menit semua eksplan mengalami kontaminasi, tidak ada yang berhasil dalam membentuk kalus (Gambar 1). Hal ini disebabkan waktu dalam proses sterilisasi eksplan masih kurang optimal, kemungkinan eksplan masih mengandung kotoran-kotoran, debu maupun berbagai kontaminan yang berada pada permukaan eksplan. Dalam penelitian ini, kontaminan pada permukaan eksplan daun tapak dara adalah jamur. Tumbuhnya jamur pada eksplan awalnya ditandai dengan berupa kumpulan spora berwarna putih maupun coklat pada media atau eksplan yang kemudian menyebar disekeliling media dan menutupi seluruh permukaan eksplan, hingga akhirnya eksplan tersebut mati. Kontaminasi jamur ini rata-rata muncul pada hari ketiga dan hari kelima. Kontaminasi jamur lebih dominan terjadi pada kultur karena hifa jamur yang cukup ringan dan banyak terdapat diudara sehingga cukup sulit dikendalikan kontaminasinya dibanding bakteri.

Masalah pada pembuatan kalus selain kontaminasi adalah rusaknya jaringan eksplan atau *browning* pada waktu sterilisasi 55 dan 60 menit (Gambar 2). Hal ini mengakibatkan eksplan tidak dapat tumbuh membentuk kalus, namun pada sterilisasi dengan waktu 55 menit ada beberapa yang

dapat membentuk kalus sebesar 30 %. *Browning* merupakan suatu karakter munculnya warna coklat atau hitam akibat adanya peristiwa teroksidasinya senyawa fenol menjadi quinon yang berasal dari eksplan yang bersifat toksik dan sering timbul akibat proses sterilisasi pada eksplan. Senyawa fenol umumnya menghambat pertumbuhan dan perkembangan eksplan atau bahkan menyebabkan kematian jaringan (Andaryani, 2010; Fitriani dkk., 2019).

Browning umumnya disebabkan oleh senyawa fenolik yang biasanya muncul dan terakumulasi saat eksplan dilukai, biasanya disebabkan oleh aktivasi enzim *Polyphenol Oxidase* (PPO). Pembukaan organ dapat menyebabkan ketidakseimbangan metabolisme dari *Reactive Oxygen Species* (ROS), peroksidasi membran lipid, dan hilangnya integritas membran sel yang dapat memicu akumulasi senyawa fenolik berlebihan dan menyebabkan *browning* (I'anatusshoimah dkk., 2020). Oksidasi fenol akan meningkat dengan adanya cahaya (Hutami, 2016). Oksidasi yang terjadi pada senyawa fenolik dapat melalui autoksidasi atau reaksi oksidasi enzimatik (Andarwulan dan Faradilla, 2012). Enzim PPO, bila terjadi secara meluas dengan adanya oksigen dan cahaya akan mengubah gugus monofenol menjadi orto-hidroksi fenol kemudian diubah lagi menjadi gugus orto-kuinon. Gugus orto-kuinon ini membentuk warna coklat (I'anatusshoimah dkk., 2020).

Menurut Santosa dan Nursandi (2003) *browning* ini juga dapat disebabkan oleh penggunaan bahan tanaman jaringan yang dewasa, tindakan berlebihan dalam sterilisasi, media yang tidak cocok atau lingkungan yang tidak mendukung. Faktor teknis saat penanaman juga sangat mempengaruhi, seperti penggunaan pisau dan pinset yang masih panas dan lamanya proses pengeringan eksplan yang sudah disterilisasi dengan larutan sterilan pada saat penanaman.

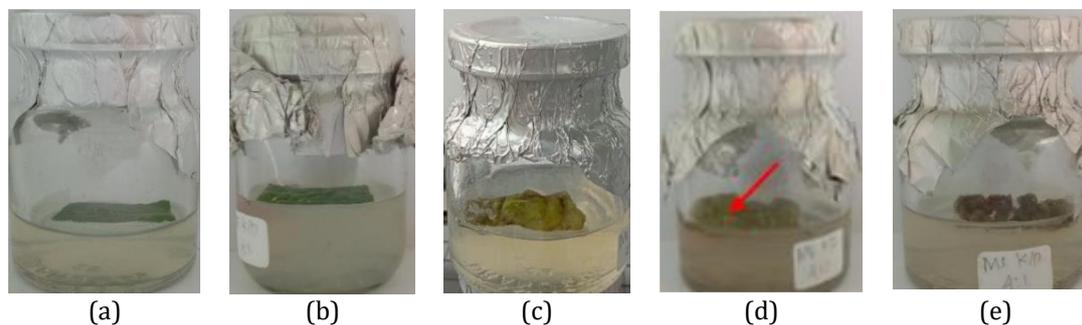
Upaya untuk mengatasi *browning* pada kultur dapat dilakukan dengan penambahan senyawa askorbat, modifikasi lingkungan kultur dengan menempatkan dalam ruangan gelap total, subkultur berulang atau pencelupan dalam cairan seperti arang aktif dan sukrosa (Corduk dan Aki, 2011). Penelitian Admojo dan Indrianto (2016), pencegahan *browning* pada induksi kalus kultur daun klon karet dengan perendaman asam askorbat steril 100 mg/L selama 30 menit sebelum tanam dan inkubasi dalam kondisi gelap dapat mencegah munculnya *browning* hingga mampu terbentuk kalus. Kalus yang telah terbentuk disarankan segera disubkultur pada media diferensiasi kalus untuk mencegah terjadinya *browning* susulan akibat terlalu lama berada dalam media yang sama.

Pengaruh Kombinasi Zat Pengatur Tumbuh 2,4 D dan Kinetin

Selain teknik sterilisasi eksplan, hasil yang optimum juga akan didapatkan dengan penambahan zat pengatur tumbuh untuk merangsang pembentukan dan pertumbuhan kalus. Menurut George dkk. (2008), untuk pembentukan kalus dibutuhkan fitohormon berupa auksin dan sitokinin. Senyawa auksin dan sitokinin secara endogen terdapat di dalam tanaman sehingga pada eksplan daun juga mengandung auksin dan sitokinin. Kartika dkk. (2013) menyatakan bahwa auksin dapat mengubah aktivitas enzim yang berperan dalam sintesis komponen dinding sel dan menyusunnya kembali menjadi matriks dinding sel yang utuh yang akan mempengaruhi berat sel. Auksin dapat mendorong pemanjangan sel yang diikuti dengan pembesaran sel dan peningkatan bobot basah. Menurut (Zulkarnain, 2009), pemberian sitokinin ke dalam media kultur jaringan penting untuk menginduksi perkembangan dan pertumbuhan eksplan. Jika ketersediaan sitokinin dalam media kultur sangat terbatas, maka pembelahan sel dalam jaringan akan terhambat.

Penelitian ini digunakan penambahan zat pengatur tumbuh untuk kedua golongan hormon tersebut, berupa 2,4 D sebagai auksin dan kinetin sebagai sitokinin. Pemilihan 2,4 D karena mempunyai sifat stabil, tidak mudah terurai oleh enzim-enzim yang dikeluarkan sel atau pemanasan pada proses sterilisasi (Kartikasari dkk., 2013). Diantara jenis-jenis auksin 2,4 D sangat efektif untuk menginduksi terbentuknya kalus dan pertumbuhan kalus (Manuhara, 2014). Pemilihan kinetin juga digunakan karena kinetin penting dalam pengaturan pertumbuhan dan morfogenesis pada kultur *in vitro* (George dan Sherrington, 1984).

Penanaman atau inokulasi eksplan daun tapak dara dilakukan secara aseptik. Eksplan diletakkan pada media padat kemudian ditekan pelan-pelan agar terjadi persinggungan yang baik antara eksplan dan media (Gambar 3a). Keberhasilan inokulasi eksplan dalam pembentukan kalus ditandai dengan adanya respon positif berupa benjolan-benjolan kecil pada eksplan yang muncul pada hari ke 3 sejak inokulasi eksplan (Gambar 3b). Pada 7 hari terlihat respon positif kembali



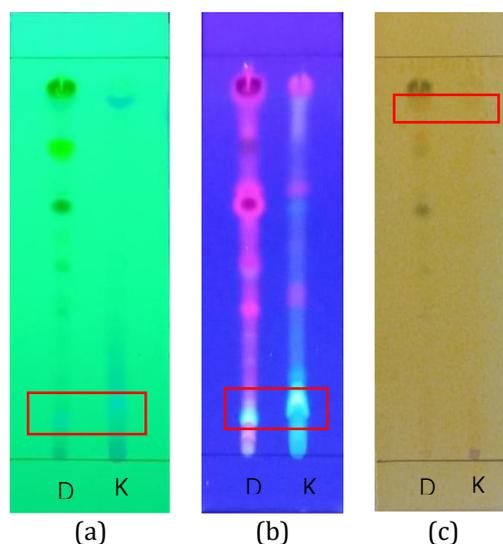
Gambar 3. Inokulasi eksplan daun tapak dara dengan 2,4 D dan kinetin. (a) Pertama kali inokulasi eksplan, (b) respon positif eksplan, (c) pembengkakan eksplan, (d) mulai muncul kalus berupa titik putih, (e) kalus pada hari ke 21



Gambar 4. Inokulasi eksplan daun tapak dara tanpa 2,4 D dan kinetin pada hari ke 21

dengan terjadinya pembengkakan atau menggulungnya bagian-bagian tertentu dari eksplan daun (Gambar 3c). Tonjolan berupa titik putih pada irisan eksplan menunjukkan mulai adanya tumbuh kalus yang terlihat pada hari ke 14 (Gambar 3d) dan pada 21 hari eksplan sudah terbentuk kalus (Gambar 3e). Hasil penelitian ini menunjukkan penambahan zat pengatur 2,4 D 1 mg/L dan kinetin 4 mg/L berpengaruh dalam memacu keberhasilan pembentukan dan pertumbuhan kalus dengan rata-rata berat basah dan berat kering kalus masing-masing sebesar 2,359 dan 0,249 gram. Inokulasi eksplan pada media tanpa penambahan zat pengatur tumbuh 2,4 D 1 mg/L dan kinetin 4 mg/L pada inkubasi 21 hari, eksplan tidak mampu membentuk kalus meskipun memberikan respon positif (Gambar 4). Kalus yang dihasilkan pada penelitian ini mempunyai tekstur yang kompak dan remah serta warna putih kehijauan. Tekstur kalus merupakan salah satu penanda yang digunakan untuk menilai kualitas kalus. Tekstur kalus yang kompak dinilai baik karena mampu mengakumulasi metabolit sekunder lebih banyak (Yelnititis, 2012). Menurut Kusumawardhani (2017), Kalus yang berwarna putih kehijauan dan bertekstur meremah merupakan kalus terbaik, disebut dengan kalus embriogenik yang berkorelasi dengan kecepatan tumbuh sel sehingga produksi metabolit sekunder tertentu dapat segera dicapai.

Kecepatan induksi kalus pada tiap eksplan berbeda- beda karena kecepatan pembelahan sel pada tiap eksplan juga berbeda. Munculnya kalus ini merupakan reaksi penutupan jaringan akibat adanya pelukaan pada jaringan tersebut (Sartika dan Santosa, 2012). Pembentukan kalus pada jaringan luka dipacu oleh zat pengatur tumbuh auksin dan sitokinin endogen. Secara *in vivo*, umumnya kalus terbentuk pada bekas luka akibat serangan infeksi mikroorganisme dan *stress* (PYD dkk., 2012). Menurut Pandiangan dan Nainggolan (2006), analisis pertumbuhan kalus ditunjukkan dengan pertumbuhan linier berakhir pada hari ke 21 setelah inisiasi kalus. Maka kalus disubkultur sekali tiap 3 minggu agar pertumbuhan kalus tidak sempat menurun yang dapat mempengaruhi produksi alkaloidnya.



Gambar 5. Kromatogram ekstrak daun dan kalus tapak dara, (a) disinari UV 254 nm, (b) disinari UV 366 nm, (c) disemprot pereaksi Dragendorff ; D= ekstrak daun tapak dara (tanaman asli), K= ekstrak kalus daun tapak dara

Identifikasi Senyawa Alkaloid Menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Metode KLT digunakan untuk identifikasi golongan senyawa alkaloid ekstrak kalus daun tapak dara dengan mengamati warna bercak yang timbul dibandingkan dengan ekstrak daun tapak dara. Fase diam pada system ini dipakai silika gel 60 F254 dan fase gerak berupa campuran kloroform:metanol (9:1) dengan jarak pengembangan 8 cm. Deteksi senyawa menggunakan sinar UV 254 nm dan 366 nm serta pereaksi Dragendorff. Hasil analisis ekstrak daun dan kalus tapak dara menunjukkan pemisahan yang baik dengan sistem KLT tersebut.

Profil KLT ekstrak daun dan kalus tapak dara menunjukkan hasil yang mirip. Ketika plat disinari dengan UV 254 tidak terbentuk warna, tapi terjadi peredaman fluoresensi dengan nilai R_f 0,11 pada ekstrak daun dan ada 2 bercak pada ekstrak kalus dengan nilai R_f masing-masing 0,15 dan 0,89 (Gambar 5a). Deteksi dengan sinar UV 366 menunjukkan adanya bercak yang berfluoresensi biru dengan nilai R_f 0,11 pada ekstrak daun dan 0,18 pada ekstrak kalus (Gambar 5b). Setelah plat disemprot dengan pereaksi Dragendorff terdapat bercak berwarna jingga yang dapat dilihat secara visual dengan nilai R_f 0,86 pada ekstrak daun dan 0,89 pada ekstrak kalus (Gambar 5c). Bercak berwarna jingga dengan pereaksi Dragendorff tersebut menandakan adanya senyawa golongan alkaloid (Samsumaharto dkk., 2010). Hasil penelitian menunjukkan bahwa baik kalus maupun daun tanaman aslinya sama-sama mengandung senyawa alkaloid. Produksi metabolit sekunder dengan kalus ini hanya diperlukan jaringan tanaman yang sedikit saja dari tanaman asli dan jaringan tersebut dapat diperbanyak dalam waktu singkat untuk menghasilkan senyawa yang sama dengan tanaman aslinya. Kultur kalus ini memiliki kelebihan dalam produksi metabolit sekunder dibandingkan dengan tanaman aslinya yaitu tidak memerlukan lahan yang luas, tidak adanya keterbatasan iklim serta senyawa aktif yang diperoleh bersifat kontinyu dalam keadaan terkontrol (Sugiyarto dan Kuswandi, 2014).

KESIMPULAN

Kombinasi zat pengatur tumbuh 2,4 D dan kinetin mampu memacu pembentukan dan pertumbuhan kalus. Berat kalus yang diperoleh dalam penelitian ini yaitu dengan rata-rata berat basah dan berat kering kalus masing-masing sebesar 2,359 dan 0,249 gram. Kalus yang dihasilkan berwarna putih kehijauan dengan tekstur kompak dan remah. Kalus daun tapak dara hasil kultur jaringan dengan penambahan kombinasi zat pengatur tumbuh 2,4 D dan kinetin mengandung senyawa alkaloid yang sama dengan tanaman aslinya.

DAFTAR PUSTAKA

- Admojo, L. dan Indrianto, A., 2016. Pencegahan Browning Fase Inisiasi Kalus Pada Kultur Midrib Daun Klom Karet (*Hevea brasiliensis* Muell.Arg) **34**: 25–34.
- Andarwulan, N. dan Faradilla, R.F., 2012. Senyawa Fenolik Pada Beberapa Sayuran Indigenous Dari Indonesia. *Bogor: Southeast Asian Food and Agricultural Science and Technology (SEAFAST) Center Research and Community Service Institution Bogor Agricultural University*.
- Andaryani, S., 2010. Kajian penggunaan berbagai konsentrasi BAP dan 2,4-D terhadap induksi kalus jarak pagar (*Jatropha curcas* L.) secara in vitro. *Skripsi Universitas Sebelas Maret Surakarta*.
- Corduk, N. dan Aki, C., 2011. Inhibition of browning problem during micropropagation of *Sideritis trojana* Bornm. an endemic medicinal herb of Turkey. *Romanian Biotechnological Letters*, **16**: 6760–6765.
- Darsini, N.N., 2011. Perkembangan Latisifer Pada Kultur Kalus *Catharanthus roseus* (L) G. Don Yang Diinduksi Dengan Kombinasi Zat Pengatur Tumbuh Kinetin + NAA 5. *Jurnal Biologi*, **15**: 34–38.
- Fitriani, Y., Wijana, G., dan Darmawati, I.A.P., 2019. Teknik Sterilisasi Dan Efektivitas 2,4-D Terhadap Pembentukan Kalus Eksplan Daun Nilam (*Pogostemon cablin* Benth) In Vitro. *J. Agric. Sci. and Biotechnol*, **8**: 41–52.
- George, E.F., Hall, M.A., dan Klerk, G.-J. de, 2008. *Plant Propagation by Tissue Culture*, 3rd ed. ed. Springer, Dordrecht.
- George, L. dan Eapen, S., 1999. Biotechnological Approaches For The Development Of Anticancer Drugs From Plants. *In Role Of Biotechnology In Medicinal And Aromatic Plants (Eds) 1, 2*: 1–10.
- Hutami, S., 2016. ULASAN Masalah Pencoklatan pada Kultur Jaringan. *Jurnal AgroBiogen*, **4**: 83–88.
- ʻanatushshoimah, Nurchayati, Y., Prihastanti, E., dan Hatuti, R.B., 2020. Effects of Light for Callus Induction of Mangrove Plant (*Rhizophora Apiculata* Bi) by In Vitro. *Life Science*, **9**: 138–148.
- Karimi, N., 2014. Effect of Different Growth Regulators on Callus Induction and Plant Regeneration of *Satureja* species. *Annual Research & Review in Biology*, **4**: 2646–2654.
- Kartika, L., Atmodjo, P.K., dan Purwijantiningsih, L.M.E., 2013. Kecepatan Induksi Kalus Dan Kandungan Eugenol Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz and Pav.) Yang Diperlakukan Menggunakan Variasi Jenis Dan Konsentrasi Auksin 1–15.
- Kartikasari, P., Hidayat, M.T., dan Ratnasari, E., 2013. Pengaruh Zat Pengatur Tumbuh 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid) dan Kinetin (6-Furfurylaminopurine) untuk Pertumbuhan Tunas Eksplan Pucuk Tanaman Jabon (*Anthocephalus cadamba* Miq. ex Roxb.) secara In Vitro. *LenteraBio*, **2**: 75–80.
- Kusumawardhani, L.R., 2017. Analisis Kandungan Flavonoid Dan Alkaloid Pada Kalus Tanaman Pohpohan (*Pilea Trinervia* W.) Yang Diinduksi Dengan Hormon Kinetin Dan 2,4-Diklorofenoksiasetat. *Fakultas Teknobiologi Universitas Atmajaya Yogyakarta*.
- Lombonbitung, E., Tilaar, W., dan Pandiangan, D., 2015. Kandungan Vinkristin Pada Kultur Kalus *Catharanthus roseus* (L) G. Don Yang Diberi Perlakuan Tryptofan dan Vindolin. *Jurnal Ilmiah Farmasi*, **4**: 12.
- Mahadi, I., 2012. Induksi Kalus Kenerak (*Goniothalamus umbrosus*) Berdasarkan Jenis Eksplan Menggunakan Metode In Vitro. *J. Agrotek. Trop*, **1**: 18–22.
- Namdeo A. G., 2007. Plant Cell Elicitation for Production of Secondary Metabolites: A Review. *Pharmacognosy Reviews*, **1**: 69–79.
- Nurhidayah, T., Mardiansyah, M., dan Mulyani, D., 2017. Pengaruh Sitokinin (Kinetin) dan Auksin (2,4-D) dalam Media Induksi Murashige dan Skoog terhadap Perkembangan Eksplan Meristem Apikal Tunas Anakan Tanaman Sagu (*Metroxylon sagu* Rottb.). *J. Agrotek. Trop*, **6**: 23–28.
- Pandiangan, D. dan Nainggolan, N., 2006. Produksi Alkaloid Dari Kalus (*Catharanthus roseus* (L) G. Don. *Jurnal Ilmiah Sains*, **6**: 48–54.
- Phillips, G.C. dan Garda, M., 2019. Plant tissue culture media and practices: an overview. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, **55**: 242–257.
- PYD, N.M.D., Waeniati, Muslimin, dan Suwastika, I.N., 2012. Pengaruh Penambahan Air Kelapa Dan Berbagai Konsentrasi Hormon 2,4-D Pada Medium Ms Dalam Menginduksi Kalus Tanaman Anggur Hijau (*Vitis vinifera* L.) **1**: 53–62.

- Samsumaharto, R.A., Harti, A.S., Yuansari, C.P., dan Sutoyo, J.L.J., 2010. Deteksi Alkaloid Dalam Kalus Daun Tapak Dara (*Catharanthus roseus* (L) G. Don Dengan Perlakuan Kombinasi Hormon NAA dan FAP pada Kultur In Vitro 8.
- Sartika, D. dan Santosa, D., 2012. Pengaruh Kombinasi Zat Pengatur Tumbuh (2,4 D Dan Kinetin) Terhadap Pertumbuhan Dan Kandungan Metabolit Sekunder Pada Kalus *Phaleria Macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) 5: 53-62.
- Shukla, A.K., Shasany, A.K., Gupta, M.M., dan Khanuja, S.P.S., 2006. Transcriptome analysis in *Catharanthus roseus* leaves and roots for comparative terpenoid indole alkaloid profiles. *Journal of Experimental Botany*, 57: 3921-3932.
- Sitorus, E.N., Hastuti, E.D., dan Setiari, N.-, 2011. Induksi Kalus Binahong (*Basella rubra* L.) Secara In Vitro Pada Media Murashige & Skoog Dengan Konsentrasi Sukrosa Yang Berbeda. *Bioma : Berkala Ilmiah Biologi*, 13: 1-7.
- Sugiri, A., 2005. Pembentukan Kalus Embrioid Kultur Ovary Pisang Melalui Beberapa Komposisi Media Kultur. *Pengantar Falsafah Sains*, 1-8.
- Sugiyarto, L. dan Kuswandi, P.C., 2014. Pengaruh 2,4-Diklorofenoksiasetat (2,4-D) Dan Benzyl Aminopurin (BAP) Terhadap Pertumbuhan Kalus Daun Binahong (*Anredera cordifolia* L.) Serta Analisis Kandungan Flavonoid Total. *Jurnal Penelitian Saintek*, 19: 23-30.
- Yelnititis, 2012. Pembentukan Kalus Remah Dari Eksplan Daun Ramin (*Gonystylus bancanus* (Miq) Kurz.). *Jurnal Pemuliaan Tanaman Hutan*, 6: 181-194.
- Zulkarnain, 2009. *Kultur Jaringan Tanaman. Solusi Perbanyak Tanaman Budi Daya*. Jakarta: Bumi Aksara.