

## **Pengaruh 2,4-D (Asam Diklorofenoksi Asetat) dan BAP (Benzyl Amino Purin) terhadap Proliferasi Kalus dan Produksi Metabolit Sekunder dari Kalus Kencur (*Kaemferia galanga* L.)**

### **(Influence Of 2,4-D (Diclorophenoxy Acetic Acid) and BAP (Benzyl Amino Purine) on Callus Proliferation and Secondary Metabolite Production from *Kaemferia galanga* Callus )**

ANIS SHOFIYANI <sup>1\*</sup>, NENI DAMAJANTI <sup>2</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Muhammadiyah Purwokerto

<sup>2</sup>Program Studi Teknik Kimia, Fakultas Teknik, Universitas Muhammadiyah Purwokerto  
Jl. Raya Dukuwaluh, PO.BOX 202, Purwokerto, Jawa Tengah, Indonesia 53182.

Diterima, 15 Maret 2017, Disetujui 5 Juli 2017

**Abstrak:** Penelitian ini bertujuan mencari kombinasi konsentrasi 2,4-D (asam diklorofenoksi asetat) dan BAP (benzyl amino purin) yang memberikan pengaruh terbaik terhadap proliferasi kalus serta mengetahui pengaruh interaksi antara 2,4-D dan BAP terhadap perolehan kultur kalus kencur yang pertumbuhannya baik dan mampu menghasilkan metabolit sekunder kencur. Perlakuan untuk proliferasi kalus yaitu kombinasi 2,4 D (1–3 mg/L) dan BAP (0–0,2 mg/L). Semuanya disusun acak dalam rancangan acak lengkap (RAL) dengan tiga ulangan, dan setiap unit perlakuan menggunakan 10 botol kultur. Kombinasi perlakuan yang efektif untuk proliferasi kalus adalah 2,4 D konsentrasi 1–3 mg/L dan tanpa penambahan BAP (B0) dimana menunjukkan hasil proliferasi kalus yang terbentuk memiliki volume kalus, bobot segar kalus, bobot kering kalus serta morfologi kalus (keremahan dan warna kalus) yang lebih baik dibandingkan dengan penambahan BAP, 2,4 D dengan konsentrasi 1 mg/L memberikan tingkat proliferasi kalus terbaik diantaranya volume kalus, bobot segar kalus, bobot kering kalus, keremahan kalus yang tinggi dan warna kalus yang putih, krem dan jernih. Semakin tinggi konsentrasi 2,4 D hingga 3 mg/L berpengaruh pada pembentukan warna kalus menjadi hijau dan mengarah pada proses organogenesis (pembentukan tunas dan akar). Berdasarkan uji analisis kualitatif menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT), ekstrak metanol kalus kencur hasil penelitian mengandung senyawa metabolit sekunder berupa alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, steroid dan etil para-metoksisinamat.

**Kata kunci:** 2,4 D dan BAP, kalus kencur, metabolit sekunder, *in vitro*.

**Abstract:** The aim of this research is to find combination of 2,4-D (diclorophenoxy acetic acid) and BAP (benzyl amino purine) concentration which give the best influence to callus proliferation and to know the effect of interaction between 2,4-D and BAP to obtain good growth culture of *Kaemferia galanga* L callus and able to produce secondary metabolite. The design used for callus proliferation was a combination of 2.4 D (1–3 mg/L) and BAP (0–0.2 mg/L). All were randomly arranged in a complete randomized design (RAL) with three replicates, and each treatment unit used 10 bottles of culture. The combination of effective treatment for callus proliferation was 2,4 D concentrations of 1 to 3 mg/L and without the addition of BAP (B0). 2,4 D with 1 mg/L concentration gave the best callus proliferation rate indicated at callus volume, fresh weight of callus, dried weight callus and the weakness high and white light colour with friable nature. The higher concentration of 2.4 D to 3 mg/L in the formation of callus color to green and on the process of organogenesis (shoot and root formation). Based on qualitative analysis test using thin layer chromatography (TLC), extract methanol callus *Kaemferia galanga* research results contain secondary metabolite compounds in the form of alkaloids, flavonoids, tannins, saponins, steroids and ethyl para-methoxycinnamate.

Key word: 2,4 D and BAP, *Kaemferia galanga* callus, secondary metabolite, *in vitro*.

\* Penulis korespondensi, Hp. 081391406392  
e-mail: anisshofiyani@ump.ac.id

## PENDAHULUAN

KENCUR sebagai tanaman khas Indonesia banyak digunakan sebagai bahan baku obat tradisional (jamu), fitofarmaka, industri kosmetika, penyedap makanan dan minuman, rempah, serta kosmetik<sup>(1)</sup>. Secara empirik kencur digunakan sebagai obat dalam gangguan pencernaan, nyeri dingin, pektoral dan perut, sakit kepala, ekspektoran, gangguan kulit diuretik dan kulit karat, rematik dan diabetes melitus, aktivitas antihipertensi dan larvisidal, diabetes melitus<sup>(2)</sup>.

Minyak atsiri didalam rimpang kencur mengandung etil sinnamat dan metil p-metoksisinamat yang banyak digunakan didalam industri kosmetika dan dimanfaatkan sebagai obat asma dan anti jamur. Banyaknya manfaat kencur memungkinkan pengembangan pembudidayaannya dilakukan secara intensif yang disesuaikan dengan produk akhir yang diinginkan<sup>(3)</sup>.

Senyawa saponin, flavonoid, fenol serta minyak atsiri yang terkandung di dalam kencur merupakan hasil metabolit sekunder suatu tanaman<sup>(4)</sup>. Dalam kenyataannya, produksi metabolit sekunder dari rimpang kencur untuk kebutuhan industri sangat dipengaruhi oleh keberadaan dan pertumbuhan tanaman di lapang yang tentunya dipengaruhi oleh berbagai faktor lingkungan seperti tanah, nutrisi, iklim serta hama dan penyakit. Salah satu upaya lain yang dapat dilakukan untuk menghasilkan metabolit sekunder adalah dengan teknologi kultur *in vitro*<sup>(5)</sup>. Faktor yang menentukan keberhasilan kultur kalus adalah komposisi media yang tepat, kombinasi zat pengatur tumbuh dan kondisi lingkungan tempat kultur. Senyawa 2,4-D (asam diklorofenoksi asetat) merupakan auksin kuat yang sering digunakan secara tunggal untuk menginduksi terbentuknya kalus dari berbagai jaringan tanaman<sup>(6)</sup>. Zat pengatur tumbuh ini juga efektif untuk pembentukan kalus dan kandungan tannin pada kalus jarak pagar secara *in vitro*<sup>(7)</sup>. Induksi kalus pada medium Murashige & Skoog (MS) dengan penambahan 1 mg/L 2,4 D dan 0.5 mg/L BAP (benzyl amino purin) juga terjadi pada eksplan rhizome bud *Kaemferia galanga*<sup>(8)</sup>. Penelitian lainnya yang dilakukan untuk mencari lini sel kalus *K. galanga* yang digunakan untuk produksi senyawa bioaktif yang penting secara ilmiah dalam skala besar dengan menggunakan bioreaktor dimana kalus yang berasal dari akar, mata tunas dan rimpang tanaman. Dari 26 lini sel kalus yang digunakan diperoleh delapan lini sel yang dapat dipilih sebagai lini yang bersifat stabil dengan penambahan 2,4 D di dalam media<sup>(9)</sup>.

Tujuan penelitian ini adalah untuk memperoleh sumber bahan baku obat berupa metabolit sekunder

melalui proliferasi kalus, sehingga dapat membantu penyediaan bahan baku obat dalam industri farmasi berupa produk metabolit sekunder dari kalus tanaman kencur (*Kaemferia galanga*) yang tidak tergantung kondisi lingkungan dan dengan jumlah produksi yang setabil.

## BAHAN DAN METODE

**BAHAN.** Bahan yang akan digunakan sebagai eksplan adalah kalus yang berasal dari jaringan meristem mata tunas kencur varietas Galesia 3 yang berasal dari kebun percobaan Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat, Bogor. 2,4-D; BAP; alkohol; alumunium foil; aquades; asam sulfat; agar; sukrosa; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O; CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O; FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; KI; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O; NaMoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O; NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>; Na<sub>2</sub>EDTA; Myoinositol; Thiamin-HCl; Asam Nikotinat; Piridoksin-HCl; Glisin; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; buffer HCl dan NaOH 1M.

**ALAT.** *Laminair air flow cabinet* (HALF-250); *Autoclav* (All American 1925X 25Qt 24L); *Hot plate magnetic stirer* (Favorit HS0707V2); timbangan analitis (Ohaus adventurer AR 1140); pH meter (ProfiLine pH3110); bejana kromatografi lapis tipis (KLT) (TLC chamber, Camag); lempeng silika gel F 254 (Merck); sumuran *96-microwell plate* (BioOne) dan densitometer (TLC Scanner 4, Camag); skalpel; blade; pinset; lampu spirtus; gelas ukur; batang pengaduk; botol kultur dan rak kultur.

**METODE.** Medium dasar yang digunakan adalah MS (Murashige dan Skoog, 1962) standar serta zat pengatur tumbuh sesuai perlakuan. Keasaman medium diatur hingga mencapai nilai pH 5,6 – 5,7.

Penyediaan eksplan dilakukan dengan cara mengambil potongan jaringan meristem dari mata tunas rimpang kencur yang sudah terpilih dan disterilisasikan. Sterilisasi menggunakan metode yang diperoleh dari penelitian sebelumnya yaitu dengan cara merendam dalam 70% etanol selama 1 menit, kemudian perendaman dalam 6 % kaporit selama 20 menit, selanjutnya dibilas dengan akuades steril 3 kali<sup>(10)</sup>. Eksplan meristem selanjutnya ditanam dalam media induksi tunas dengan perlakuan 2,4 D 1 mg/L.

Kalus yang terbentuk dari media induksi tunas digunakan sebagai eksplan dalam penelitian ini. Perlakuan untuk proliferasi kalus adalah kombinasi konsentrasi 2,4-D dengan taraf 1, 2 dan 3 mg/L media dan BAP dengan taraf 0, 0,1 dan 0,2 mg/L media. Semuanya disusun acak dalam rancangan acak lengkap (RAL) dengan tiga ulangan, dan setiap unit perlakuan menggunakan 10 botol kultur.

**Variabel Pengamatan dan Analisa Data.** Pengamatan dilakukan setelah kalus ditanam berumur 2 minggu setelah inokulasi. Pengamatan meliputi; bobot segar kalus, bobot kering kalus, volume kalus, morfologi kalus dan analisis kualitatif kandungan metabolit sekunder kalus kencur secara KLT (kromatografi lapis tipis). Data yang diperoleh dianalisis dengan analisis of varian (ANOVA) pada tingkat kepercayaan 95%, analisis lanjutan dengan “*Duncan’s New Multiple Range Test (DNMRT)*” pada tingkat kepercayaan 95%. Uji statistik dilakukan dengan menggunakan program “*Statistica for Windows Release 5 Statsoft, Inc. 1995*”.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

**Volume Kalus.** Hasil analisis sidik ragam variabel pengamatan volume kalus dalam media proliferasi kalus menunjukkan bahwa ada beda nyata pada perlakuan penambahan zat pengatur tumbuh 2,4 D dan BAP, dan terjadi interaksi antara keduanya. Interaksi terbaik terjadi pada kombinasi perlakuan 2,4 D pada konsentrasi 1 mg/L dan tanpa BAP (D1B0) yaitu sebesar 1,83 cm<sup>3</sup> yang berbeda nyata dengan hampir semua kombinasi perlakuan, dan volume kalus terendah terjadi pada kombinasi perlakuan 2,4 D pada konsentrasi 3 ppm dan BAP 0,2 mg/L (D3B2) yaitu sebesar 0,08 cm<sup>3</sup>. Untuk lebih jelasnya dapat dilihat Tabel 1.

**Tabel 1. Pengaruh Perlakuan 2,4 D dan BAP dalam Media Proliferasi Kalus terhadap Variabel Pengamatan Volume Kalus yang Terbentuk (cm<sup>3</sup>), Bobot Segar Kalus (g) dan Bobot Kering Kalus (mg).**

Perlakuan	Volume Kalus (cm <sup>3</sup> )	Bobot Segar Kalus (g)	Bobot Kering Kalus (mg)
2,4 D 1 mg/L + BAP 0 mg/L (D1B0)	1,83 e	1,739 e	77 e
2,4 D 1 mg/L + BAP 0,1 mg/L (D1B1)	0,47 c	0,637 c	27 b
2,4 D 1 mg/L + BAP 0,2 mg/L (D1B2)	0,40 b	0,450 b	19 b
2,4 D 2 mg/L + BAP 0 mg/L (D2B0)	1,23 d	1,290 d	50 e
2,4 D 2 mg/L + BAP 0,1 mg/L (D2B1)	0,60 c	0,590 bc	26 b
2,4 D 2 mg/L + BAP 0,2 mg/L (D2B2)	0,13 a	0,163 a	7 a
2,4 D 3 mg/L + BAP 0 mg/L (D3B0)	1,33 d	1,440 d	61 d
2,4 D 3 mg/L + BAP 0,1 mg/L (D3B1)	0,17 ab	0,163 a	7 a
2,4 D 3 mg/L + BAP 0,2 mg/L (D3B2)	0,08 a	0,153 a	6 a

Ket. Angka-angka yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata pada pengujian DMRT 5%.

Pengaruh perlakuan 2,4 D dan BAP dalam media proliferasi kalus terhadap variabel pengamatan volume kalus terlihat bahwa penambahan zat pengatur tumbuh dalam media proliferasi kalus memberi pengaruh

signifikan terhadap pertumbuhan kalus. Sel kalus yang diperbanyak dalam media proliferasi kalus ternyata memberikan respon pertumbuhan terbaik pada hampir semua perlakuan 2,4 D tanpa penambahan BAP (B0) hal ini terlihat dari rerata pembentukan volume kalus yang cukup besar pada perlakuan tersebut bila dibandingkan dengan perlakuan penambahan BAP.

Penambahan 2,4 D pada perbanyakkan kalus memberikan pengaruh nyata terhadap proses pembentukan kalus. Kecepatan sel membelah diri dipengaruhi oleh kombinasi auksin dan sitokinin dalam konsentrasi tertentu, selain itu juga tergantung pada jenis eksplan yang digunakan serta faktor pendukung pertumbuhan sel lainnya seperti media, ketersediaan unsur hara makro/mikro, karbohidrat, bahan tambahan kompleks seperti air kelapa juga faktor fisik seperti cahaya, pengocokan, suhu dan pH media selama pertumbuhan kalus<sup>(11)</sup>.

Pemberian 2,4 D secara tunggal diduga mampu memacu aktivitas pembelahan sel kalus dalam penelitian ini. Pemberian 2,4 D dan thidiazuron (TDZ) berpengaruh nyata terhadap pertumbuhan dan regenerasi kalus<sup>(12)</sup>. Perlakuan 2,4 D cenderung menurunkan persentase pertumbuhan kalus namun meningkatkan pertumbuhan dan regenerasi kalus. Pada perlakuan 2,4 D 1 mg/L pertumbuhan kalus tertinggi mencapai 175 mm<sup>3</sup> diikuti oleh 2,4 D 2,0 mg/l dengan 152 mm<sup>3</sup>.

**Bobot Segar Kalus (g).** Hasil analisis sidik ragam bobot segar kalus (g) dalam medium proliferasi kalus menunjukkan bahwa ada pengaruh nyata perlakuan zat pengatur tumbuh 2,4 D dan BAP terhadap variabel pengamatan bobot segar kalus, dan terjadi interaksi antara keduanya (Tabel 1).

Bobot segar terbaik terdapat pada kombinasi perlakuan 2,4 D pada konsentrasi 1 mg/L dan tanpa penambahan BAP (D1B0) yaitu seberat 1,793 g yang berbeda nyata dengan hampir seluruh kombinasi perlakuan. Sedangkan perlakuan paling rendah terdapat pada kombinasi perlakuan 2,4 D dengan konsentrasi 3 ppm dan BAP konsentrasi 0,2 mg/L (D3B2) yaitu seberat 0,153 g. Perlakuan 2,4 D pada semua level konsentrasi tanpa penambahan BAP dalam penelitian ini memberikan bobot basah terbaik dibandingkan dengan penambahan BAP. Pengaruh 2,4 D sebagai golongan auksin diduga menginduksi terjadinya sekresi ion H<sup>+</sup> keluar melalui dinding sel. Pengasaman dinding sel menyebabkan ion K<sup>+</sup> diambil yang menyebabkan penurunan potensial air dalam sel, akibatnya air akan mudah masuk kedalam sel dan terjadi pembesaran sel akibat akumulasi air tersebut<sup>(13)</sup>.

**Bobot Kering Kalus (g).** Hasil analisis sidik ragam bobot kering kalus (mg) dalam medium proliferasi kalus menunjukkan bahwa ada pengaruh

nyata perlakuan zat pengatur tumbuh 2,4 D dan BAP terhadap variabel pengamatan bobot kering kalus, dan terjadi interaksi antara keduanya. Bobot kering terbaik terdapat pada kombinasi perlakuan 2,4 D pada konsentrasi 1 mg/L dan tanpa penambahan BAP (D1B0) yaitu seberat 77 mg yang berbeda nyata dengan hampir seluruh kombinasi perlakuan. Sedangkan perlakuan terendah terdapat pada kombinasi perlakuan 2,4 D dengan konsentrasi 3 ppm dan BAP konsentrasi 0,2 mg/L (D3B2) yaitu seberat 6 mg.

Bobot kering kalus menggambarkan aktivitas kalus pada berbagai kombinasi perlakuan yang diberikan dalam penelitian ini. Penggunaan 2,4 D dalam media proliferasi kalus diduga mampu mempengaruhi metabolisme RNA yang berperan mengontrol metabolisme protein di dalam sel yang kemungkinan dilakukan pada proses transkripsi molekul RNA<sup>(14)</sup>. Dengan meningkatnya sintesa protein tersebut berdampak pada pertumbuhan kalus yang meningkat diimbangi dengan bertambahnya sumber tenaga untuk pertumbuhan. Zat pengatur tumbuh 2,4 D yang diberikan memacu pertumbuhan dan proses metabolisme yang terjadi di dalam sel, digambarkan dengan pertambahan ukuran dan bobot kering kalus yang tidak balik. Pertumbuhan berkaitan dengan pertambahan volume dan jumlah sel, pembentukan protoplasma baru, penambahan berat dan berdampak juga pada peningkatan bobot kering kalus dalam penelitian ini. Bobot kering yang terbentuk selama penelitian ini merupakan gambaran akumulasi bahan organik dan mineral yang berperan penting dalam pertumbuhan kalus kencur.

**Morfologi Kalus.** Berdasarkan hasil analisis sidik ragam keremahan kalus dalam medium proliferasi kalus menunjukkan bahwa tidak ada pengaruh nyata perlakuan zat pengatur tumbuh 2,4 D dan BAP terhadap variabel pengamatan bobot segar kalus, namun terjadi interaksi antara keduanya. Morfologi kalus dengan keremahan tertinggi terdapat pada kombinasi perlakuan 2,4 D pada konsentrasi 1 mg/L dan tanpa penambahan BAP (D1B0) yang tidak berbeda nyata dengan kombinasi perlakuan 2,4 D konsentrasi 2 mg/L dan tanpa BAP (D2B0) yaitu masing-masing sebesar 3. Sedangkan keremahan terendah terdapat pada kombinasi perlakuan 2,4 D dengan konsentrasi 3 mg/L dan BAP konsentrasi 0,1 mg/L (D3B1) yaitu sebesar 1,3. Untuk lebih jelasnya data morfologi kalus berupa tingkat keremahan kalus dan warna kalus dapat dilihat pada Tabel 2.

**Tabel 2. Pengaruh Perlakuan 2,4 D dan BAP dalam Media Proliferasi Kalus terhadap Variabel Pengamatan Keremahan Kalus dan Warna Kalus.**

Perlakuan	Keremahan Kalus	Warna Kalus
2,4 D 1 mg/L + BAP 0 mg/L (D1B0)	3,0 b	P,K,J
2,4 D 1 mg/L + BAP 0,1 mg/L (D1B1)	2,3 ab	K,C
2,4 D 1 mg/L + BAP 0,2 mg/L (D1B2)	2,0 ab	P,K,C
2,4 D 2 mg/L + BAP 0 mg/L (D2B0)	3,0 a	P,K,J
2,4 D 2 mg/L + BAP 0,1 mg/L (D2B1)	2,0 ab	P,K,C
2,4 D 2 mg/L + BAP 0,2 mg/L (D2B2)	1,7 a	P,K
2,4 D 3 mg/L + BAP 0 mg/L (D3B0)	2,3 ab	K,H
2,4 D 3 mg/L + BAP 0,1 mg/L (D3B1)	1,3 a	K,C
2,4 D 3 mg/L + BAP 0,2 mg/L (D3B2)	2,0 ab	K,C

Ket. Angka-angka yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata pada pengujian DMRT 5%

1 : remah + sedikit kompak , 2 : remah ++ (sedang) , 3 : remah +++ (sangat remah).

P : putih, K : krem, C : coklat, H : hijau, J : jernih.



A (D1B0) = 2,4 D 1 mg/L B (D2B0) = 2,4 D 2 mg/L C (D3B0) = 2,4 D 3 mg/L

**Gambar 1. Pertumbuhan dan Perkembangan Kalus dalam Media Proliferasi Kalus dengan Penambahan 2,4 D (1-3 mg/L) dan Tanpa BAP (0 mg/L).**

Morfologi kalus yang terbentuk dalam media proliferasi kalus menunjukkan kalus yang terbentuk secara umum bersifat remah. Kalus yang ditumbuhkan pada media 2,4 D tanpa penambahan BAP berbentuk remah dan berwarna putih, krem dan jernih. Pembentukan kalus yang remah terbentuk karena pertumbuhan yang mengarah pada pembentukan sel-sel yang berukuran kecil dan memiliki ikatan yang longgar, namun demikian semakin ditingkatkan konsentrasi 2,4 D hingga 3 mg/L menunjukkan terbentuknya warna hijau pada kalus. Dalam hal ini 2,4 D sebagai auksin memiliki peran terhadap pembentukan kalus remah. 2,4 D merupakan salah satu zat pengatur tumbuh jenis auksin yang berfungsi merangsang pemanjangan sel dengan cara meningkatkan plastisitas dinding sel menjadi lebih longgar, menyebabkan air dapat masuk kedalam dinding sel secara osmosis dan sel mengalami pembesaran dan pemanjangan<sup>(15)</sup>. Sel kalus yang remah mudah dipisahkan antara kumpulan sel yang satu dengan lainnya karena mengandung banyak air dan lignifikasi dinding sel belum terbentuk.

Pertumbuhan kalus yang baik dicirikan oleh penampakan kalus yang berwarna bening/keputihan dan mempunyai struktur yang remah. Kalus tersebut

banyak mengandung air sehingga mempunyai bobot segar yang lebih tinggi. Hal ini mengindikasikan bahwa proliferasi kalus pada tanaman kencur menghendaki 2,4-D dan BAP dalam konsentrasi rendah atau tanpa pemberian BAP. Penggunaan BAP dalam konsentrasi yang lebih tinggi (BAP 0,2 mg/L) selain mengurangi volume dan bobot segar kalus, juga menurunkan kualitas kalus yang dapat dilihat dari perubahan struktur dan warna kalus, yaitu cenderung menjadi lebih kompak dan berwarna krem hingga coklat.

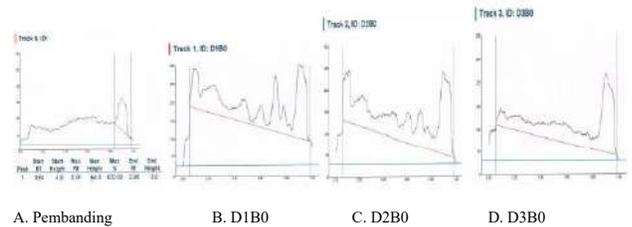
**Analisis Kualitatif Kandungan Metabolit Sekunder Kalus Kencur secara KLT (Kromatografi Lapis Tipis).** Hasil penapisan kimia yang dilakukan dengan metode KLT (kromatografi lapis tipis) terhadap kalus kencur dari hasil perbanyakan dalam media proliferasi kalus dengan perlakuan 2,4 D pada konsentrasi 1-3 mg/l dan tanpa penambahan BAP (B0) menunjukkan bahwa ekstrak etanol kalus kencur (*Kaemferia galanga* L) positif mengandung alkaloid, flavonoid, saponin, steroid dan etil p-metoksisinamat (EPMS) seperti ditunjukkan dalam Tabel 3.

Tabel 3 menunjukkan bahwa ekstrak etanol kalus kencur hasil perbanyakan dalam media proliferasi kalus terpilih mengandung kelompok senyawa metabolit sekunder alkaloid yang ditandai dengan timbulnya bercak noda berwarna jingga setelah disemprot pereaksi kimia Dragendorff pada nilai Rf sebesar 0,88. Ekstrak etanol kalus kencur juga mengandung metabolit sekunder flavonoid yang ditandai dengan timbulnya noda berwarna biru kekuningan pada saat sesudah disemprot dengan pereaksi kimia Sitroborat dengan nilai Rf sebesar 0,07 dibawah sinar UV 366. Kandungan saponin dalam ekstrak etanol kalus kencur juga terindikasi hal tersebut terlihat dari munculnya bercak noda berwarna merah jambu setelah disemprot dengan pereaksi kimia Liberman Burchat dengan nilai Rf sebesar 0,45. Kandungan terpenoid dalam ekstrak etanol kalus kencur juga terindikasi hal tersebut terlihat dari munculnya bercak noda berwarna ungu kehitaman setelah disemprot dengan pereaksi kimia anisaldehyd-asam sulfat dengan nilai Rf sebesar 0,11.

**Tabel 3. Hasil Penapisan Kimia dengan Metode KLT terhadap Ekstrak Kalus.**

Kandungan Kimia	RF	Sebelum disemprot			Setelah disemprot		Hasil
		UV 254	UV 366	Tampak	UV 366	Tampak	
Akaloid	0.88	hitam	biru	-	-	jingga	+
Terpenoid	0.11 0.17 0.29 0.58 0.75	hitam	-	-	-	ungu kehitaman	+
Flavonoid	0.07	hitam	biru	-	biru kekuningan	-	+
Saponin	0.45	hitam	biru	-	-	merah jambu	+
EPMS	0,84						+

Kandungan senyawa identitas kencur (*Kaemferia galanga* L) etil p-metoksisinamat (EPMS) dalam ekstrak etanol kalus kencur juga terindikasi terlihat pada nilai Rf 0,84 dan teridentifikasi jelas setelah dilakukan identifikasi dengan CAMAG TLC Scanner dengan hasil seperti pada gambar 2.



**Gambar 2. Hasil KLT Etil Para-Metoksisinamat (EPMS) Standar yang Digunakan sebagai Pembanding (A), Hasil KLT Kandungan Senyawa EPMS Ekstrak Etanol Kalus Kencur Perlakuan 2,4 D 1 mg/L dan BAP 0 mg/L (B), Perlakuan 2,4 D 2 mg/L dan BAP 0 mg/L (C) dan Perlakuan 2,4 D 3 mg/L dan BAP 0 mg/L (D).**

Berdasarkan hasil penapisan senyawa kimia yang terdapat didalam ekstrak etanol kalus kencur hasil penelitian menunjukkan bahwa senyawa kimia identitas pada tanaman kencur berupa etil para-metoksisinamat terbentuk dalam kalus pada berbagai perlakuan konsentrasi 2,4 D yang diberikan dengan tanpa penambahan BAP. Dalam hal ini EPMS yang terbentuk dan teridentifikasi menunjukkan jumlah kadar yang beragam. Secara kualitatif dengan identifikasi menggunakan TLC Scanner terhadap kandungan EPMS untuk perlakuan pembanding memberikan luas area sebesar 5.984,9 nm, perlakuan 2,4 D konsentrasi 1 mg/L tanpa BAP (D1B0) memberikan luas area sebesar 14.871,1 nm, perlakuan 2,4 D konsentrasi 2 mg/L tanpa BAP memberikan luas area sebesar 15.166,6 nm, sedangkan perlakuan 2,4 D 3 mg/L tanpa BAP (D3B0) memberikan luas area sebesar 14.083,4 nm. Luas area yang terbentuk dari hasil pemindaian TLC Scanner berkorelasi dengan jumlah kandungan senyawa kimia identitas EPMS yang dikandung sampel kalus dari masing-masing perlakuan 2,4 D pada media proliferasi kalus. Berdasarkan hasil pemindaian tersebut maka dapat disimpulkan bahwa kandungan senyawa kimia EPMS tertinggi terdapat dalam kalus yang ditumbuhkan dengan penambahan 2,4 D dengan konsentrasi 2 mg/L, yaitu seluas 15.166,6 nm. Dan sel kalus yang terbentuk pada media proliferasi kalus berpotensi sebagai sel yang mampu menghasilkan senyawa kimia aktif etil para-metoksi sinamat yang berperan dalam pengobatan.

## SIMPULAN

Kombinasi perlakuan yang efektif untuk proliferasi/perbanyakkan kalus adalah 2,4 D konsentrasi 1–3 mg/L dan tanpa penambahan BAP (B0) dimana menunjukkan hasil proliferasi kalus yang terbentuk memiliki volume kalus, bobot segar kalus, bobot kering kalus serta morfologi kalus (keremahan dan warna kalus) yang lebih baik dibandingkan dengan penambahan BAP dan kalus yang dihasilkan berpotensi sebagai penghasil metabolit sekunder alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, steroid dan etil para-metoksisinamat.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didukung secara finansial oleh Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat, Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi melalui Program Riset Terapan DIPA Dikti Tahun Anggaran 2016.

## DAFTAR PUSTAKA

- Narayanaswamy R and Ismail IS, 2015. Cosmetic potential of Southeast Asian herbs: an overview. *Phytochem Rev* (2015) 14:419-428. DOI 10.1007/s11101-015-9396-2.
- Jagadish, P.C., Chandrashekhar, H.R., Vinod, K.S., Latha, K.P., 2010. Potent selective cytotoxic activity of *Kaempferia galanga* L. rhizome against cancer cell cultures. *Int. J. Pharma. Bio Sciences* 1. V1(2) 2010.
- Oti R, Rosita SMDM, M. Rahardjo dan Taryono, 2005. *Budidaya Tanaman Kencur*, Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatika, Bogor.
- Indrayanto G, Rahayu R, Rahman A, Noeraini PE (1993) Effect of calcium, strontium and magnesium ions on the formation of phytosteroid in callus culture of *Agave ameniensis*. *Planta med* 59:97-98.
- Kalpna M, Anbazhagan M. 2009. In vitro production of *Kaempferia galanga* (L.)-An endangered medicinal plant. *J Phytology*. 1:56-61.
- Bhojwani SS and Razdan MK (1996), *Plant Tissue Culture: Theory and Practice*, A Revised Edition, Elsevier, Amsterdam.
- Syahid SF, Kristina NN, Dan Seswita D, 2010. Pengaruh Komposisi Media Terhadap Pertumbuhan Kalus Dan Kadar Tannin Dari Daun Jati Belanda (*Guazuma ulmifolia* Lamk) Secara In Vitro, *Jurnal Litri* 16(1), Maret 2010. Hlm. 1 - 5 ISSN 0853 - 8212
- Laksmi, M. and Mythili.S. 2003. Somatic embryogenesis and Plant Regeneration from Callus culture of *Kaempferia galanga* L- a Medicinal Plant. *Journal of medicinal and Aromatic plant Sciences* 25 (4):947-51.
- Kuen, TG, Khaladalla MM, Bhatt A and Keng CL., 2011. Callus Induction And Cell Line Establishment From Various Explants Of *Kaempferia* L. *International Journal of Current Research*, Vol. 3, Issue, 12, pp.001-4.
- Shofiyani A dan Damajanti N, 2015. Pengembangan Metode Sterilisasi Pada Berbagai Eksplan Guna Meningkatkan Keberhasilan Kultur Kencur (*Kaempferia galanga* L), *AGRITECH* : Vol. XVII No. 1 Juni 2015: 55 – 64. ISSN : 1411-1063.
- Gunawan, L.W., 1988. *Teknik Kultur Jaringan*. Lab. Kultur Jaringan Tanaman Depdikbud Dirjen Dikti, PAU Bioteknologi, IPB Bogor.
- Winarto, B, N.A. Mattjik), A. Purwito, dan B. Marwoto, 2009. Aplikasi 2,4-D dan TDZ dalam pembentukan dan Regenerasi Kalus pada Kultur Anther *Anthurium*. *J. Hort.* 20(1):1-9, 2010
- Rahayu B, Solichatun, Dan E. Anggarwulan, 2003. Pengaruh Asam 2,4-Diklorofenoksiasetat (2,4-D) terhadap Pembentukan dan Pertumbuhan Kalus serta kandungan Flavonoid Kultur Kalus *Acalypha indica*. *Biofarmasi* 1 (1): 1-6, Februari 2003, ISSN: 1693-2242
- Maftuchah, Ardiana, H.K dan Joko, B.S. 1998. Induksi kalus *Artemisia* (*Artemisia vulgaris* L.) melalui kultur in vitro. *Tropika* 6 (2): 135-41
- Salisbury, dan Ross. 1992. *Fisiologi Tumbuhan*. ITB Press. Bandung.