

INDUKSI KALUS DARI EKSPLAN NODUS *Stelecocharpus burahol* (Blume) Hook. f & Thomson SEBAGAI UPAYA KONSERVASI *IN VITRO*

Astrid Ayu Sekar, Ratih Restiani*, Aniek Prasetyaningsih

Prodi Biologi, Fakultas Bioteknologi, Universitas Kristen Duta Wacana

Jl. Dr. Wahidin Sudirohusodo, No.5-25, Kecamatan Gondokusuman, Kotabaru 55224 Yogyakarta

*email: ratih.rsetiani@staff.ukdw.ac.id

Dikirim: 15 November 2022 Direvisi: 13 Januari 2023 Diterima: 02 Februari 2023

Abstrak

Tanaman Kepel (*Stelechocarpus burahol* (Blume) Hook. f. & Thomson) merupakan salah satu jenis tanaman asli Indonesia yang mengandung metabolit sekunder dan potensial sebagai antioksidan, antibakteri, antifungi, anti inflamasi, dan anti implantasi. Namun, saat ini tanaman kepel berstatus *conservation dependent*, sehingga diperlukan perbanyakan tanaman kepel melalui kultur *in vitro*. Penelitian ini bertujuan untuk menghasilkan metode perbanyakan tanaman kepel secara *in vitro* melalui tahap induksi kalus dengan mengoptimasi kombinasi dan konsentrasi BAP (*Benzylaminopurin*) dan IAA (*Indole-3-acetic acid*). Penelitian ini menggunakan desain Rancangan Acak Lengkap (RAL) satu faktor dengan kombinasi konsentrasi BAP dan IAA (0,1,2,5, dan 5 mgL⁻¹) sebanyak 16 perlakuan masing-masing 3 ulangan. Eksplan nodus yang ditanam dalam medium MS dengan penambahan BAP dan IAA dikultur pada suhu 25 ± 2 °C, kondisi terang 24 jam dengan intensitas cahaya 3000 flux selama 30 hari. Pengamatan waktu induksi kalus, persentase pertumbuhan kalus dan intensitas kalus dilakukan setiap minggu selama 28 hari masa tanam. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan ANOVA dan tidak dilanjutkan uji Duncan karena hasil yang diperoleh tidak berbeda signifikan (p ≥ 0,05). Hasil menunjukkan bahwa penambahan 1 mgL⁻¹ BAP dan 5 mgL⁻¹ IAA menghasilkan waktu induksi tercepat yaitu 4,67 ± 1,15 hari, sedangkan medium MS dengan penambahan 5 mgL⁻¹ BAP dan 2,5 mgL⁻¹ IAA merupakan kombinasi konsentrasi terbaik dalam pembentukan kalus (100%) dan intensitas kalus sebesar 0,57 ± 0,34 dengan tekstur remah berwarna kehijauan. Hasil penelitian ini dapat menjadi informasi penting dalam upaya konservasi tanaman kepel secara *in vitro*.

Kata kunci: BAP, IAA, kalus, nodus, *Stelecocharpus burahol*.

CALLUS INDUCTION ON *Stelecocharpus burahol* (Blume) Hook. f & Thomson NODES EXPLANTS AS A STRATEGY OF *IN VITRO* CONSERVATION

Abstract

Kepel plant (*Stelechocarpus burahol* (Blume) Hook. F. & Thomson) is a native plant from Indonesia which contain secondary metabolites and has potential as antioxidants, antibacterials, antifungals, anti-inflammatories, and anti-implantation. Nowadays, kepel is categorized as conservation dependent, thus it is necessary to propagate kepel plants through *in vitro* culture. This study aims to produce an *in vitro* method for propagating kepel plants by optimizing the combination and concentration of BAP (*Benzylaminopurine*) and IAA (*Indole-3-acetic acid*). Nodal explants grown in MS medium with the addition of BAP and IAA were cultured at 25 ± 2 °C, 24 hours of light with 3000 light flux intensity for 30 days. Observation of callus induction time, callus growth percentage, and callus intensity were carried out every week for 28 days of growing period. The data obtained were analyzed using ANOVA and not continued with Duncan's test because the results obtained were not significantly different (p ≥ 0,05). The results showed that the addition of 1 mgL⁻¹ BAP and 5 mgL⁻¹ IAA resulted in the fastest induction time of 4.67 ± 1.15 days, whereas MS medium with the addition of 5 mgL⁻¹ BAP and 2.5 mgL⁻¹ IAA is the best combination of concentration in callus formation (100%) and a callus intensity of 0.57 ± 0.34 with a greenish texture. The results of this study give shed light on the establishment of *in vitro* conservation methods of kepel plant.

Keywords: BAP, callus, IAA, nodes, *Stelecocharpus burahol*.

*Korespondensi: Ratih Restiani, Email: ratih.rsetiani@staff.ukdw.ac.id

1. PENDAHULUAN

Stelechocarpus burahol (Blume) Hook. f. & Thomson atau dikenal dengan istilah kepel, merupakan salah satu tanaman asli Indonesia. Tanaman ini merupakan anggota famili Annonaceae, dapat tumbuh mencapai tinggi 6 - 20 m, batang lurus berwarna coklat tua dengan permukaan yang tidak rata, daun tunggal memanjang, bunga tunggal dan memiliki bau yang harum (Angio & Firdiana, 2021). Tanaman ini telah lama dimanfaatkan dalam pengobatan tradisional yaitu sebagai obat kontrasepsi, mengurangi bau keringat, memperlancar, urin, mengurangi bau mulut serta sebagai anti kanker, alzheimer dan aterosklerosis (Angio & Firdiana, 2021; Suparmi *et al.*, 2015). Setiap bagian dari tanaman ini mengandung senyawa metabolit sekunder yang menjadikannya berkhasiat sebagai tanaman obat. Daging buahnya mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, polifenol, triterpenoid, saponin dan kuinon yang memiliki efek antiimplantasi serta berpotensi sebagai deodoran alami. Bagian daunnya mengandung senyawa terpenoid dan flavonoid yang berfungsi sebagai antioksidan penangkal radikal bebas dan antibakteri (Hidayat *et al.* 2011). Banyaknya potensi yang dimiliki *S. burahol* khususnya dalam pengobatan tradisional mengakibatkan statusnya masuk dalam kategori *conservation dependent*. Hal ini disebabkan karena buahnya dianggap kurang memiliki nilai ekonomi, sehingga masyarakat melakukan eksploitasi tanpa diimbangi budidaya berkelanjutan. Oleh karena itu, perlu upaya konservasi untuk mencegah kelangkaan tanaman kepel (Handayani *et al.*, 2021; Herlina *et al.*, 2018 ; Darusman *et al.*, 2012).

Salah satu strategi yang dapat dilakukan untuk mencegah kelangkaan *S. burahol* adalah melalui teknik kultur *in vitro* sebagai upaya konservasi *ex situ*. Kultur *in vitro* merupakan salah satu upaya yang dilakukan untuk menghasilkan bibit yang berkualitas dalam jumlah banyak (Habibah *et al.*, 2013). Melalui kultur *in vitro* akan dihasilkan anakan baru yang memiliki sifat identik dengan induknya, terbebas dari hama penyakit dan dapat diperbanyak dalam waktu yang singkat. Keberhasilan perbanyak tanaman secara *in vitro* sangat dipengaruhi oleh jenis eksplan, jenis zat pengatur tumbuh (ZPT), kombinasi dan konsentrasi ZPT yang ditambahkan ke dalam medium kultur. Sitokinin seperti BAP (6-*Benzylaminopurine*) dan auksin seperti IAA

(*Indole-3-acetic acid*) merupakan jenis ZPT yang sering digunakan untuk menginduksi pertumbuhan tunas, kalus, pertambahan panjang batang, dan perakaran (Hemmati *et al.*, 2020; Habibah *et al.*, 2018; Tan *et al.*, 2010). Jenis eksplan seperti nodus juga merupakan salah satu eksplan yang memiliki daerah jaringan meristematik aksiler yang aktif membelah sehingga respons pertumbuhannya lebih tinggi. Hal ini dibuktikan oleh berbagai penelitian yang berhasil mengoptimasi penggunaan BAP dan IAA untuk induksi kalus pada beberapa jenis tanaman. Mahadi & Sari (2016) memperoleh pertumbuhan kalus jeruk kasturi yang optimal pada medium kultur dengan penambahan 2,0 mgL⁻¹ BAP. Pada penelitian yang dilakukan oleh Naz & Khatoon (2014), dihasilkan pertumbuhan kalus terbaik dengan menggunakan eksplan daun tanaman *Achyranthes aspera* dalam media MS dengan penambahan IAA sebesar 0,25 mgL⁻¹. Prakasha dan Umesha (2018) memperoleh pertumbuhan kalus yang optimal pada konsentrasi hormon IAA sebesar 2 mgL⁻¹. Penelitian mengenai pengaruh BAP dan IAA terhadap regenerasi *in vitro* tanaman kepel menggunakan eksplan nodus belum pernah dilakukan. Oleh karena itu, penelitian mengenai pengaruh konsentrasi dan kombinasi BAP dan IAA pada medium MS terhadap regenerasi eksplan nodus tanaman kepel secara *in vitro* penting untuk dilakukan sebagai upaya konservasi secara *in vitro*.

2. BAHAN DAN METODE

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi neraca analitik, pH meter, oven, *Laminar Air Flow*, pisau scalpel, lampu bunsen, dan botol kultur (inokulasi eksplan). Bahan yang digunakan adalah tanaman kepel (*Stelecocharpus burahol*) umur 1 tahun, medium Murashige dan Skoog (MS), medium pertumbuhan (BAP & IAA), detergen cair, Tween 80, klorox 10%, alkohol 70%, fungisida (Carbendazim) 5%, asam askorbat 200 mgL⁻¹ (senyawa anti-*browning*).

Metode

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimental. Dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) 1 faktor untuk mengetahui pengaruh kombinasi dan konsentrasi BAP dan IAA (0,1,2,5, dan 3 mgL⁻¹) terhadap waktu induksi kalus, persentase pertumbuhan kalus dan intensitas kalus.

Jumlah perlakuan sebanyak 15 dan 1 kontrol (Tabel 1), masing-masing perlakuan diulang sebanyak 3 kali.

Sterilisasi dan Inokulasi Eksplan

Eksplan yang digunakan adalah bagian nodus yang diisolasi dari tanaman kepel berumur 1 tahun dan telah dipelihara di Laboratorium Bioteknologi Dasar lantai 2, Fakultas Bioteknologi UKDW. Eksplan dipilih dari tanaman kepel yang sehat, bebas hama, daunnya berwarna hijau, dan tidak layu. Sebelum eksplan digunakan, tanaman kepel diidentifikasi di laboratorium Sistematik Tumbuhan, Fakultas Biologi UGM bertujuan untuk memastikan bahwa tanaman yang digunakan adalah *Stelecocharpus burahol* (Blume) Hook. f & Thomson.

Tahap pra-sterilisasi dan sterilisasi eksplan dilakukan berdasarkan Hutabarat *et al.*, (2022) dengan modifikasi. Eksplan yang digunakan adalah nodus ke-2 sampai ke-3 dari pucuk. Nodus dicuci dengan air mengalir. Tahap pra-sterilisasi dilakukan dengan perendaman nodus dalam campuran detergen cair, akuades (9:1), dan tween 80 sebanyak 3 tetes selama 45 detik, kemudian

eksplan dibilas menggunakan akuades steril sebanyak 3 kali sampai bersih dan dilanjutkan tahap sterilisasi di LAF. Tahap sterilisasi dilakukan dengan perendaman eksplan dalam 10% klorox selama 10 menit, dilanjutkan perendaman dalam 70% alkohol selama 10 menit, direndam dalam 5% larutan Carbendazime selama 15 menit, eksplan dibilas sebanyak 3 kali menggunakan akuades steril sampai bersih. Sebelum diinokulasi, berdasarkan Dolonseda *et al.*, (2021) eksplan direndam terlebih dahulu dalam larutan 200 mgL⁻¹ asam askorbat selama 15 menit.

Medium MS dengan penambahan BAP dan IAA pada berbagai konsentrasi (Tabel 1). Medium selanjutnya ditambahkan dengan sukrosa sebanyak sukrosa 30 g L⁻¹, dan myo-inositol 0,1 g L⁻¹. pH medium diatur menjadi 5,7 – 5,8 dan ditambahkan agar sebagai pematat sebanyak 0,48 gr. Medium dipanaskan sampai larutan homogen dan agar larut sempurna, kemudian medium disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C tekanan 1 atm selama 30 menit. Eksplan ditanam pada medium dan dipelihara di ruang inkubasi pada suhu 25 ± 2 °C, kondisi terang 24 jam dan intensitas cahaya 3000 flux selama 30 hari.

Tabel 1. Variasi perlakuan kombinasi dan konsentrasi ZPT

Kode perlakuan	Zat pengatur tumbuh (mgL ⁻¹)	
	BAP	IAA
T0	0	0
T1	0	1
T2	0	2,5
T3	0	5
T4	1	0
T5	1	1
T6	1	2,5
T7	1	5
T8	2,5	0
T9	2,5	1
T10	2,5	2,5
T11	2,5	5
T12	5	0
T13	5	1
T14	5	2,5
T15	5	5

Tabel 2. Skoring pertumbuhan kalus pada eksplan nodus menurut Dolonseda *et al.*, (2021)

Skoring	Keterangan
0 – 0,24	$0 < \frac{1}{4}$ bagian eksplan ditumbuhi kalus
0,25 – 0,49	$\frac{1}{4} < \frac{1}{2}$ bagian eksplan ditumbuhi kalus
0,50 – 0,74	$\frac{1}{2} < \frac{3}{4}$ bagian eksplan ditumbuhi kalus
0,75 – 0,99	$\frac{3}{4} < 1$ bagian eksplan ditumbuhi kalus
1,00	Semua bagian eksplan ditumbuhi kalus

Pengamatan Tahap Pertumbuhan Kalus

Pengamatan dilakukan terhadap waktu induksi kalus, persentase pertumbuhan kalus, dan intensitas kalus setelah 28 hari pengamatan, sedangkan induksi kalus pada eksplan nodus diamati setiap minggu. Pengukuran intensitas kalus dilakukan berdasarkan skoring pertumbuhan kalus pada nodus eksplan (Tabel 2).

Analisis Data

Data waktu induksi kalus dan intensitas kalus disajikan sebagai rerata ± standar deviasi (SD) dan dianalisis menggunakan ANOVA. Data tahap pertumbuhan kalus (meliputi warna dan tekstur kalus) dan persentase pertumbuhan kalus dianalisis secara deskriptif berdasarkan hasil pengamatan visual (minggu ke-1 sampai 4) dan perhitungan persentase pertumbuhan kalus sebagai berikut :

$$\text{Persentase pertumbuhan kalus} = \frac{\text{Jumlah eksplan yang tumbuh kalus}}{\text{Total eksplan yang ditanam}} \times 100\%$$

(Hutabarat *et al.*, 2022)

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Tahap Induksi Kalus pada Nodus Eksplan

Eksplan nodus tanaman kepel yang ditanam dalam medium MS dengan penambahan berbagai konsentrasi BAP dan IAA selama 30 hari menunjukkan respons pembentukan kalus. Pada penelitian ini, nodus digunakan sebagai eksplan

karena mengandung jaringan meristem yang masih aktif dalam pembelahan sel, sehingga diharapkan proses induksi kalus dan regenerasi *in vitro* dapat berlangsung secara cepat. Nodus juga mengandung hormon pertumbuhan endogen yang berperan dalam mengatur kecepatan pertumbuhan eksplan dalam sistem *in vitro* (Tabel 3).

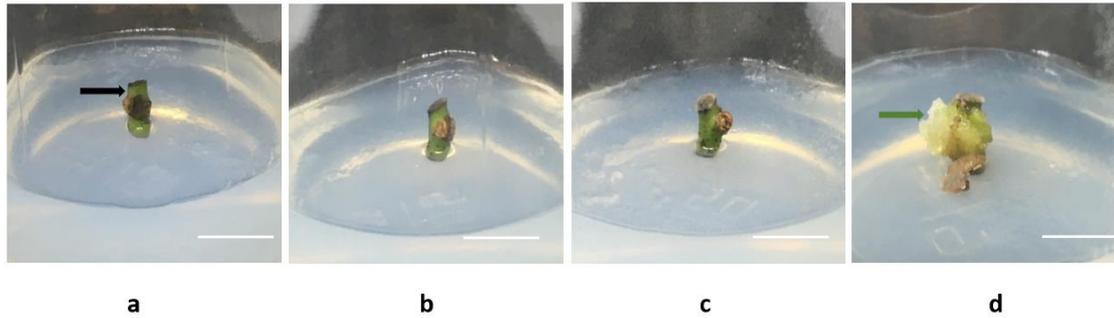
Tahap induksi kalus pada eksplan nodus (Gambar 1a) diawali dengan adanya pembengkakan di bagian nodus yang telah mengalami pelukaan pada saat tahap pemotongan eksplan. Nodus yang telah membengkak akan patah disetiap perlakuan lalu membentuk kalus dengan warna kuning kehijauan (Gambar 1d). Pembengkakan yang terjadi pada eksplan dapat disebabkan eksplan mengabsorpsi nutrisi, air dan ZPT yang ada dalam medium (Linardi *et al.*, 2022; Wijaya *et al.*, 2020). Kalus dapat terbentuk sebagai mekanisme penutupan luka oleh eksplan yang mengalami perlukaan jaringan (Ikeuchi *et al.*, 2013; Iwase *et al.*, 2011). Perlukaan jaringan eksplan merupakan sinyal eksternal yang selanjutnya mengaktifkan faktor transkripsi AP2/ERF Apetala2 (AP2)/Ethylene Responsive Element Binding Factor, atau dikenal dengan *Wound Induced Dedifferentiation 1* (WIND1) yang berperan sebagai regulator ekspresi gen penutup luka (gen *inducible*). Aktivasi gen penutup luka tersebut dapat berlangsung setelah beberapa jam terjadi perlukaan. Aktivasi gen penutup luka tersebut menyebabkan proses dediferensiasi sel (sel memasuki fase siklus pembelahan sel kembali).

Proses induksi kalus juga dapat distimulasi oleh penambahan hormon auksin dan sitokinin ke dalam medium kultur (hormon eksogen). Kedua jenis hormon pertumbuhan ini pada rasio yang seimbang umumnya akan menginduksi kalus. Pada beberapa penelitian rasio hormon sitokinin lebih besar dari auksin atau sebaliknya juga dapat menginduksi pembentukan kalus. Sesuai dengan hasil penelitian ini, konsentrasi BAP (sitokinin) yang lebih tinggi (5 mgL^{-1} BAP) dibandingkan konsentrasi IAA (auksin) sebesar $2,5 \text{ mgL}^{-1}$ dapat memberikan respon pertumbuhan kalus dan intensitas kalus yang lebih tinggi (Gambar 1). Perbedaan respon pembentukan kalus dapat disebabkan perbedaan fase perkembangan eksplan, jenis eksplan dan konsentrasi hormon endogen yang ada dalam eksplan. Penambahan ZPT ke dalam medium dapat mengubah kesetimbangan rasio hormon endogen yang telah ada pada eksplan.

Auksin dan sitokinin memiliki mekanisme berbeda dalam menginduksi pembentukan kalus. Auksin menginduksi pembentukan kalus melalui jalur transduksi sinyal faktor transkripsi ARF *Auxin Response Factor7* (ARF7) and ARF19 yang selanjutnya akan mengaktifkan ekspresi faktor transkripsi *Lateral Organ Boundaries Domain* (LBD16, LBD17, LBD18, and LBD29). Faktor transkripsi LBD selanjutnya mengaktifasi *Promoter Binding Factor a* (E2Fa E2) yang menginisiasi transkripsi gen-gen yang dibutuhkan dalam replikasi DNA. Jalur pengaktifan berbagai faktor transkripsi ARF-LBD-E2Fa tersebut merupakan kontrol ekspresi gen dalam siklus pembelahan sel. Sitokinin menginduksi pembentukan kalus melalui jalur transduksi sinyal yang mengaktifasi faktor transkripsi type-B ARR. Faktor transkripsi ini yang kemudian akan meregulasi ekspresi gen CYCD3. Sitokinin juga meregulasi ekspresi gen faktor transkripsi ESR1 dan ESR2. Kedua faktor transkripsi ini menginduksi ekspresi gen CYCD1 yang menyebabkan sel pada eksplan dapat mengalami pengaktifan kembali siklus sel dan memicu terjadinya pertumbuhan kalus (Habibah *et al.*, 2018; Ikeuchi *et al.*, 2013)

Kalus merupakan kumpulan massa sel yang belum terorganisasi, bersifat aktif membelah dan berproliferasi (Efferth, 2019). Kualitas pertumbuhan kalus dapat diamati berdasarkan tekstur dan warna kalus. Berdasarkan teksturnya, kalus dibedakan menjadi kalus remah dan kompak. Kalus remah memiliki ruang antar sel yang besar, dinding sel belum mengalami lignifikasi, dan kandungan air yang tinggi sehingga strukturnya mudah dipisahkan dan berair. Hal ini umumnya merupakan respon penambahan auksin ke dalam medium yang dapat meningkatkan pelonggaran sel penyusun dinding sel sehingga sel cenderung dapat mengabsorpsi air dalam jumlah yang lebih besar. Kalus kompak memiliki tekstur padat dan sulit dipisahkan (Sari *et al.*, 2018). Kalus yang terbentuk pada penelitian ini memiliki tekstur remah dan tumbuh pada bagian nodus yang mengalami perlukaan (Gambar 1d). Pada beberapa penelitian menggunakan eksplan daging buah (biji muda, mesokarp dan nodus) *S.burahol* dalam medium MS yang ditambahkan auksin 2,4-D, picloram dan kinetin. Beberapa penelitian yang menggunakan eksplan daging buah (biji muda, mesokarp, dan nodus) *S.burahol* dalam medium MS yang ditambahkan auksin 2,4-D, picloram dan kinetin (Hutabarat *et al.*, 2022; Habibah *et al.*, 2018; Habibah *et al.*, 2016).

Berdasarkan warna, kalus menunjukkan warna putih, kuning kehijauan, hijau, dan coklat kehitaman. Perbedaan warna kalus ini disebabkan kondisi fisiologis sel penyusun kalus. Kalus berwarna putih disebabkan kalus mengandung proplastid dan belum membentuk pigmen klorofil. Kalus berwarna kuning kehijauan menunjukkan aktivitas pembelahan sel yang tinggi. Kalus berwarna hijau telah mengalami perkembangan pigmen klorofil dan kalus berwarna coklat kehitaman karena akumulasi senyawa fenol yang teroksidasi dan sel mulai mengalami penuaan (Hutabarat *et al.*, 2022; Restiani *et al.*, 2022; Wijaya *et al.*, 2020; Sari *et al.*, 2018). Gambar 1d menunjukkan kalus yang terbentuk pada eksplan nodus kepel berwarna kuning kehijauan. Hal ini mengindikasikan bahwa kalus tersebut sedang mengalami aktivitas pembelahan sel yang tinggi.



Gambar 1. Tahap induksi kalus pada eksplan nodus *S.burahol* pada medium MS + 5 mgL⁻¹ BAP dan 2,5 mgL⁻¹ IAA (a) minggu ke-1, (b) minggu ke-2, (c) minggu ke-3, dan (d). minggu ke -4. (Keterangan : panah hitam menunjukkan bagian nodus, panah hijau menunjukkan kalus tumbuh pada bagian nodus). Skala gambar : 1 cm.

Waktu Induksi Kalus, Persentase Pertumbuhan Kalus dan Intensitas Kalus

Waktu induksi, persentase pertumbuhan dan intensitas kalus dari eksplan nodus kepel yang dikultur dalam media MS dengan penambahan BAP dan IAA pada kombinasi dan konsentrasi yang berbeda menunjukkan hasil yang bervariasi (Tabel 3). Berdasarkan hasil ANOVA, variasi ZPT tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan terhadap waktu induksi, persentase dan intensitas kalus ($p > 0,05$). Kalus dari eksplan nodus kepel dapat tumbuh dalam medium MS dengan penambahan BAP dan IAA sejak hari ke 4,67 ± 1,15 - 30 ± 0,00. Waktu induksi kalus tercepat dihasilkan oleh eksplan nodus yang dikulturkan pada medium MS dengan penambahan 1 mgL⁻¹ BAP dan 5 mgL⁻¹ IAA, sedangkan waktu induksi kalus terlama pada medium MS dengan penambahan 5 mgL⁻¹ BAP dan 5 mgL⁻¹ IAA. Hasil penelitian ini menunjukkan waktu induksi kalus dari eksplan nodus kepel relatif lebih cepat dibandingkan waktu induksi kalus yang berasal dari biji muda, embrio dan daging buah (mesocarp). Habibah *et al.*, (2018) melaporkan bahwa waktu induksi kalus dari eksplan biji kepel yang belum masak berlangsung pada 18,50 ± 1,64 - 55,00 ± 1,26 hari setelah tanam yang dihasilkan dari medium MS dengan penambahan 10 ppm picloram (waktu induksi tercepat) dan 10 ppm 2,4-D (waktu induksi terlama). Habibah *et al.*, (2016) juga melaporkan waktu induksi kalus dari eksplan yang berbeda yaitu mesocarp (daging buah kepel) yang dikulturkan dalam medium MS dengan penambahan 10 mgL⁻¹ picloram menunjukkan waktu induksi kalus tercepat (20, 29 hari setelah tanam) dan 10 mgL⁻¹ 2,4-D menghasilkan waktu induksi kalus terlama (29,86 hari setelah tanam). Perbedaan respon kecepatan pembentukan kalus dari berbagai penelitian tersebut disebabkan perbedaan jenis eksplan yang digunakan. Hal ini

dapat menyebabkan perbedaan kemampuan pembelahan sel dari jaringan meristematik penyusun eksplan. Pada penelitian ini, penggunaan eksplan nodus didasari oleh keberadaan jaringan meristematik di bagian aksiler sehingga hal inilah yang menjadi salah satu faktor pendukung kecepatan waktu induksi kalus dibandingkan jenis eksplan lainnya (Bhojwani & Dantu, 2013).

Perbedaan jenis eksplan memiliki perbedaan kandungan hormon endogen yang berbeda pula. Perbedaan kandungan hormon endogen tersebut dapat mengubah rasio hormon endogen dan ZPT yang ditambahkan dari luar. Interaksi kedua hormon tersebut mempengaruhi interaksi dan responnya terhadap kecepatan pembentukan kalus. Hasil penelitian ini menguatkan teori mengenai faktor keberhasilan kultur kalus (Restiani *et al.*, 2022; Habibah *et al.*, 2016; Bhojwani & Dantu, 2013) bahwa kecepatan waktu induksi kalus sangat dipengaruhi oleh jenis eksplan, jenis, kombinasi, dan konsentrasi ZPT.

Variasi kombinasi dan konsentrasi BAP dan IAA juga berpengaruh terhadap persentase pertumbuhan kalus dan intensitas kalus. Persentase pertumbuhan kalus dari eksplan nodus kepel yang dikultur dalam berbagai medium perlakuan bervariasi antara 33% -100%. Persentase kalus tertinggi (100%) dihasilkan oleh eksplan yang dikultur dalam medium MS dengan penambahan IAA secara tunggal (2,5 mgL⁻¹ IAA), kombinasi BAP dan IAA (1 mgL⁻¹ BAP dan 5 mgL⁻¹ IAA), (5 mgL⁻¹ BAP dan 2,5 mgL⁻¹ IAA), dan bahkan kontrol (tanpa penambahan ZPT), sedangkan persentase pertumbuhan kalus terendah (33%) dihasilkan oleh eksplan yang dikultur dalam medium MS (5 mgL⁻¹ BAP dan 5 mgL⁻¹ IAA). Hasil ini mengindikasikan bahwa semakin tinggi konsentrasi BAP dan IAA yang diberikan ke dalam medium menyebabkan efek penghambatan pertumbuhan eksplan serta regenerasi eksplan.

Hasil penelitian ini linier dengan persentase pertumbuhan kalus dari eksplan mesocarp kepel yang dikultur dalam medium MS dengan variasi ZPT picloram (5, 7,5, dan 10 ppm) dan 2,4-D (10, 15, dan 20 ppm). Hasil penelitian dengan penggunaan eksplan mesocarp menunjukkan bahwa penambahan picloram pada konsentrasi 7,5 ppm menghasilkan persentase pertumbuhan kalus tertinggi sebesar 100%, sedangkan peningkatan konsentrasi picloram dan 2,4-D menyebabkan penurunan persentase pertumbuhan kalus (36 – 80%). Kedua hasil penelitian tersebut berbanding terbalik dengan persentase pertumbuhan kalus pada eksplan biji kepel yang dikulturkan dalam medium MS dengan penambahan picloram (5, 7,5 dan 10 ppm) dan 2,4-D (10, 15, dan 20 ppm). Hasil penelitian dengan eksplan biji tersebut menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi picloram dan 2,4-D menyebabkan peningkatan persentase pertumbuhan kalus sebesar 100% pada kondisi

gelap dan terang. Perbedaan respon pertumbuhan kalus ini mengindikasikan bahwa persentase pertumbuhan kalus sangat dipengaruhi oleh jenis eksplan, jenis dan konsentrasi ZPT, dan kondisi lingkungan kultur (khususnya fotoperiode cahaya) (Anis & Ahmad, 2016; Bhojwani & Dantu, 2013).

Perbedaan konsentrasi ZPT juga berpengaruh terhadap perbedaan respon intensitas kalus pada eksplan nodus. Intensitas kalus tertinggi ($0,57 \pm 0,34$) dihasilkan oleh eksplan yang dikulturkan dalam medium MS dengan penambahan 5 mgL^{-1} BAP dan $2,5 \text{ mgL}^{-1}$ IAA. Respon intensitas kalus menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi IAA yang ditambahkan ke dalam medium MS menyebabkan penurunan intensitas kalus (Tabel 3). Hal ini dapat disebabkan karena efek penghambatan auksin (IAA) terhadap hormon sitokinin (BAP) pada konsentrasi yang tinggi sehingga mengubah kedua hormon tersebut bekerja secara antagonis.

Tabel 3. Pengaruh kombinasi dan konsentrasi ZPT terhadap waktu induksi, persentase pertumbuhan dan intensitas kalus pada eksplan nodus *S.burahol* setelah 30 hari kultur

Zat pengatur tumbuh (mgL)		Paramater pertumbuhan kalus		
BAP	IAA	Waktu induksi kalus	Persentase induksi kalus (%)	Intensitas kalus
0	0	14 ± 8,72	100%*	0,42 ± 0,14
0	1	13 ± 12,73	67%	0,22 ± 0,26
0	2,5	11,33 ± 7,57	100%*	0,17 ± 0,05
0	5	17 ± 18,38	67%	0,07 ± 0,12
1	0	14 ± 14	100%*	0,2 ± 0,05
1	1	10 ± 5,29	100%*	0,35 ± 0,15
1	2,5	11 ± 7,07	67%	0,32 ± 0,37
1	5	4,67 ± 1,15*	100%*	0,31 ± 0,39
2,5	0	13 ± 12,73	67%	0,21 ± 0,26
2,5	1	10 ± 8,49	67%	0,15 ± 0,14
2,5	2,5	23 ± 1,41	67%	0,23 ± 0,08
2,5	5	22 ± 2,83	67%	0,08 ± 0,07
5	0	14 ± 14,14	67%	0,32 ± 0,42
5	1	13 ± 12,73	67%	0,33 ± 0,42
5	2,5	12,67 ± 9,02	100%*	0,57 ± 0,34*
5	5	30 ± 0	33%	0,03 ± 0,00

Keterangan: *) menunjukkan hasil terbaik

3. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian diketahui bahwa medium terbaik yang menghasilkan waktu induksi kalus dari eksplan nodus *Stelechocarpus burahol* (Blume) Hook. F. & Thomson tercepat ($4,67 \pm 1,15$ hari) adalah medium MS dengan penambahan 1 mgL^{-1} BAP dan 5 mgL^{-1} IAA. Medium terbaik untuk menghasilkan persentase pertumbuhan kalus (100%) dan intensitas kalus tertinggi ($0,57 \pm 0,34$) adalah medium MS dengan penambahan 5 mgL^{-1} BAP dan $2,5 \text{ mgL}^{-1}$ IAA. Kalus yang dihasilkan pada kombinasi medium terbaik ini adalah bertekstur remah berwarna kuning kehijauan. Hasil penelitian diharapkan menjadi informasi penting dalam optimasi medium kultur sebagai upaya konservasi tanaman kepel secara *in vitro*.

4. UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis berterima kasih kepada Fakultas Bioteknologi Universitas Kristen Duta Wacana melalui pendanaan penelitian internal Fakultas dnegan No. Kontrak 42a/D.01/Bio/2022 dan laboratorium Bioteknologi Dasar 2 Fakultas Bioteknologi UKDW untuk penyediaan sarana dan prasarana yang menunjang penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

Angio, M. H., & Firdiana, E. R. (2021). Kepel (*Stelechocarpus burahol* (Blume) Hook & Thompson), buah langka khas keraton Yogyakarta: sebuah koleksi kebun raya Purwodadi. *Warta Kebun Raya*, 19(2), 7–13.

Anis, M., & Ahmad, N. (2016). Plant tissue culture: Propagation, conservation and crop improvement. In *Plant Tissue Culture: Propagation, Conservation and Crop Improvement*. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-1917-3>

Bhojwani, S. S., & Dantu, P. K. (2013). Plant tissue culture: An introductory text. *Plant Tissue Culture: An Introductory Text*, 1–309. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-1026-9>

Darusman, H. S., Rahminiwati, M., Sadih, S., Batubara, I., Darusman, L. K., & Mitsunaga, T. (2012). Indonesian-Kepel-fruit-(*Stelechocarpus-burahol*)-as-oral-deodorant_2012_Research-Journal-of-Medicinal-Plant.pdf. In *Research Journal of Medicinal Plant* (Vol. 6, Issue 2, pp. 180–188).

Efferth, T. (2019). Biotechnology Applications of Plant Callus Cultures. *Engineering*, 5(1), 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.eng.2018.11.006>

Habibah, N. A., Moeljopawiro, S., Dewi, K., & Indrianto, A. (2018). Callus induction and flavonoid production on the immature seed of *Stelechocarpus burahol*. *Journal of Physics: Conference Series*, 983(1). <https://doi.org/10.1088/1742-6596/983/1/012186>

Habibah, Noor Aini, Moeljopawiro, S., Dewi, K., & Indrianto, A. (2016). Flavonoid Production in Callus Cultures from Mesocarp *Stelechocarpus burahol*. *Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education*, 8(2), 214. <https://doi.org/10.15294/biosaintifika.v8i2.6632>

Habibah, Noor Aini, Sumadi, & Ambar, S. (2013). Optimization of Leaf Surface Sterilization and Endophytic Elimination on *Burahol*. *Biosaintifika*, 5(2), 95–98.

Handayani, E., Irsyadi, M. B., Aris, I., Alawiyah, R. L. M. N., Ayuningtias, N., Permatasari, F., & Rineksane, I. A. (2021). Optimasi Sterilisasi Endosperma Kepel (*Stelethocarpus burahol* [Bl] Hook F. & Th) Secara *In Vitro*. *BIO-EDU: Jurnal Pendidikan Biologi*, 6(2), 113–121. <https://doi.org/10.32938/jbe.v6i2.1179>

Hemmati, N., Cheniany, M., & Ganjeali, A. (2020). Effect of plant growth regulators and explants on callus induction and study of antioxidant potentials and phenolic metabolites in *Salvia tebesana* Bunge. *Botanica Serbica*, 44(2), 163–173. <https://doi.org/10.2298/BOTSERB2002163H>

Herlina, N., Riyanto, S., Martono, S., & Rohman, A. (2018). Antioxidant activities, phenolic and flavonoid contents of methanolic extract of *stelechocarpus burahol* fruit and its fractions. *Dhaka University Journal of Pharmaceutical Sciences*, 17(2), 153–159. <https://doi.org/10.3329/dujps.v17i2.39170>

Hutabarat, C. T., Restiani, R., & Prasetyaningsih, A. (2022). Pengaruh Sterilisasi Tunggal dan Kombinasi pada Kultur *In Vitro* Nodus Kepel (*Stelechorcarpus burahol* Hook F. & Thomson). 9(September), 235–246. <https://doi.org/10.24843/metamorfosa.2022.v09.i02.p01>

Ikeuchi, M., Sugimoto, K., & Iwase, A. (2013).

- Plant callus: Mechanisms of induction and repression. *Plant Cell*, 25(9), 3159–3173. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.116053>
- Iwase, A., Mitsuda, N., Koyama, T., Hiratsu, K., Kojima, M., Arai, T., Inoue, Y., Seki, M., Sakakibara, H., Sugimoto, K., & Ohme-Takagi, M. (2011). The AP2/ERF transcription factor WIND1 controls cell dedifferentiation in arabidopsis. *Current Biology*, 21(6), 508–514. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.02.020>
- Linardi, M., Restiani, R., & Aditiyarini, D. (2022). Pengaruh Asam Salisilat Terhadap Kandungan Flavonoid pada Kultur Kalus Ginseng Jawa (*Talinum paniculatum* (Jacq.) Gaertn.). 6(2), 443–458. <http://ejournal.uki.ac.id/index.php/edumatsains%0APENGARUH>
- Mahadi, I., & Sari, Y. (2016). PENGARUH PEMBERIAN HORMON 2, 4-D DAN BAP TERHADAP PERTUMBUHAN KALUS JERUK KASTURI (*Citrus microcarpa*). 12(2), 99–104.
- Naz, S., & Khatoon, K. (2014). The effect of auxins on callus induction in *Achyranthes aspera*. *Pakistan Journal of Botany*, 46(6), 2203–2207.
- Restiani, R., Barlin, N., & Aditiyarini, D. (2022). Effect of Methyl Jasmonate on Biomass and Saponin Content in Javanese Ginseng (*Talinum paniculatum* (Jacq.) Gaertn.) Callus Culture. 9515(7), 154–158. <https://doi.org/10.36347/sajb.2022.v10i07.003>
- Sari, Y. P., Kusumawati, E., Saleh, C., Kustiawan, W., & Sukartingsih, S. (2018). Effect of sucrose and plant growth regulators on callogenesis and preliminary secondary metabolic of different explant *Myrmecodia tuberosa*. *Nusantara Bioscience*, 10(3), 183–192. <https://doi.org/10.13057/nusbiosci/n100309>
- Suparmi, S., Isradji, I., Yusuf, I., Fatmawati, D., Hapsari Ratnaningrum, I., Fuadiyah, S., Indra Wahyuni, I., & Amelia Rahmah, D. (2015). Anti-Implantation Activity of Kepel (*Stelechocarpus burahol*) Pulp Ethanol Extract in Female Mice. *The Journal of Pure and Applied Chemistry Research*, 4(3), 94–99. <https://doi.org/10.21776/ub.jpacr.2015.004.03.220>
- Tan, S. H., Musa, R., Ariff, A., & Maziah, M. (2010). Effect of plant growth regulators on callus, cell suspension and cell line selection for flavonoid production from pegaga (*Centella asiatica* L. urban). *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 6(4), 284–299. <https://doi.org/10.3844/ajbbsp.2010.284.299>
- Wijaya, R., Restiani, R., & Aditiyarini, D. (2020). Pengaruh Kitosan terhadap Produksi Saponin Kultur Kalus Daun Ginseng Jawa (*Talinum paniculatum* (Jacq.) Gaertn.) Tanaman Ginseng Jawa (*Talinum paniculatum* (Jacq.) Gaertn.) memiliki budidaya tanaman secara aseptis pada suatu diketahui berkontribusi. *Prosiding Seminar Nasional Biologi Di Era Pandemi COVID-19, September*, 252–261.