

Induksi Kalus Kenerak (*Goniothalamus umbrosus*) Berdasarkan Jenis Eksplan Menggunakan Metode *In Vitro*

Callus Induction of Kenerak Based on Explant Types Using In vitro Methods

Imam Mahadi^{1*}

¹Staf Pengajar Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan, Universitas Riau.

ABSTRACT

*A research on callus induction of kenerak (*Goniothalamus umbrosus*) from seed, leaf, stem and root explant was conducted. Results showed that, seeds explant is the best on callus initiation using MS D10 (5,0 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l BAP) medium after 24 weeks cultured in light. However, mosf of all explants from leaves, stem and root formed callus on MS E8 ((3,0 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l BAP) and E10 ((5,0 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l BAP) medium after 2-6 weeks cultured in light, respectively. Meanwhile for optimum callus proliferation, the suggessted medium was MS E10 ((5,0 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l BAP).Therefore, in vitro technique can be used to produce callus of kenerak.*

Keywords: explant kenerak, 2,4-D, BAP and callus

ABSTRAK

Sebuah penelitian inisiasi kalus pada tanaman kenerak (*Goniothalamus umbrosus*) dari eksplan biji, daun, batang dan akar telah dilakukan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa, eksplan biji adalah hasil yang terbaik untuk inisiasi kalus pada media MS D10 (5,0 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l BAP) setelah 24 minggu pengkulturan di dalam cahaya. Walau bagaimana pun semua eksplan dari daun, batang dan akar juga menghasilkan kalus dengan menggunakan media MS E8 (3,0 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l BAP) and E10 (5,0 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l BAP) setelah 2-6 minggu pengkulturan di dalam cahaya. Sementara itu untuk proliferasi kalus yang optimal disarankan media MS E10 (5,0 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l BAP) yang terbaik. Oleh karena itu teknik *in vitro* dapat digunakan untuk memproduksi kalus pada tanaman kenerak.

Kata kunci : eksplan kenerak, 2,4-D, BAP dan kalus

* Penulis untuk korespondensi. email: i_mahadi@yahoo.com

PENDAHULUAN

Goniothalamus umbrosus dikenal dengan nama lokal Kenerak oleh masyarakat melayu Kelantan Malaysia sebagai obat penggugur janin. Tumbuhan ini tersebar luas di Sumatera, Semenanjung Malaysia dan Thailand (Sounders, 2003).

Menurut Jewers *et al.* (1972) ekstrak dari *Goniothalamus* menghasilkan zat *goniotalamin*, zat ini bersifat aktif biologi yang merupakan turunan *stirilpiron*. Berdasarkan kajian laboratorium, *goniotalamin* dapat menghambat pertumbuhan atau perkembangan suatu sel dalam jaringan tubuh sehingga berpotensi mencegah atau mengobati penyakit kanker payudara (Azimahtol *et al.*, 1998).

Pada tanaman obat-obatan, kultur kalus merupakan langkah awal dalam menentukan produksi bahan metabolit sekunder. Pengujian ini penting untuk menentukan jenis eksplan yang digunakan, kandungan metabolit sekunder, sifat kalus untuk dikembangkan dalam kultur suspensi sehingga dapat menghasilkan produk yang tinggi dalam skala yang besar (Mahadi, 2008). Selanjutnya Sujata *et al.* (2011) menambahkan bahwa kultur jaringan tanaman obat-obatan lebih cenderung melalui proses pembentukan organogenesis secara tidak langsung. Ini berkaitan dengan tujuan produksi bahan metabolik sekunder, karena selalu melibatkan penghasilan agregat-agregat sel yang dikultur dalam kultur suspensi sebelum ke sistem bioreaktor, sehingga kebanyakan sasaran awal adalah untuk mendapatkan kalus (Maharajan *et al.*, 2010).

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini menggunakan bahan yaitu benih *in vitro* kenerak (*Goniothalamus umbrosus*) yang kemudian diambil organ daun, batang dan akar selanjutnya dipotong-potong 1 cm. Untuk biji diambil dari buah yang matang dari pohon, dipotong dua bagian, Medium Murashige & Skoog (MS), hormon 2,4-Dikloropenoksi asetik (2,4-D), 6-Benzilamino purin (BAP), alkohol 70% dan 96%, NaOH 0,1 N, HCl 0,1 N, agar *becto facto*, *tween* 20, makro dan mikro nutrisi, EDTA, myoinositol dan bahan-bahan pendukung lainnya.

Eksplan dikulturkan dalam medium agar inisiasi dengan kombinasi hormon 2,4-D (0 - 5mg/l) dan BAP (0 - 5mg/l) sebanyak 26 kombinasi hormon. Kultur dieram pada suhu 26-27°C dalam keadaan cahaya. Untuk setiap perlakuan mempunyai 5 replikasi. Hasil kajian diuji lanjut dengan metode Duncan (DMRT).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pembentukan Kalus pada eksplan Biji.

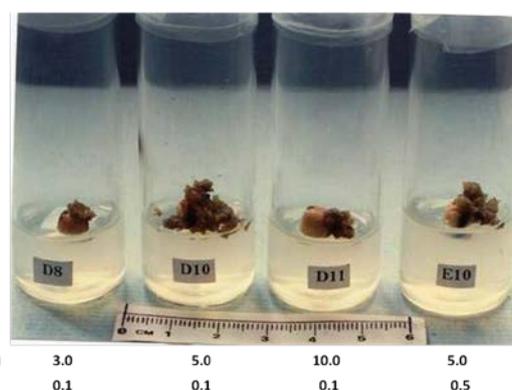
Pembentukan kalus eksplan biji hanya terjadi pada 4 kombinasi hormon dari 26 kombinasi, yaitu D8 (3,0 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l BAP), D10 (5,0 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l BAP), D11 (10 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l BAP) dan E10 (5,0 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l BAP) setelah pengkulturkan dalam cahaya (Gambar 1).

Persentase pembentukan kalus bagi masing-masing medium tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan (Tabel. 1). Medium D10 memberikan angka persentase yang tertinggi yaitu 66,6% diikuti oleh medium D11 53,3%, D8 46% dan E10 46%.

Analisis varian rata-rata lebar kalus yang terbentuk menunjukkan perbedaan yang nyata di antara perlakuan hormon. Medium D10 menghasilkan rerata lebar kalus terbaik yaitu $22,8 \pm 0,9$ mm, sedangkan kombinasi hormon lainnya tidak membentuk kalus.

Kalus biji mula terbentuk pada 6 bulan setelah pengeraman. Perkembangan kalus sangat perlahan sampai bulan ke 7. Sebulan setelah kalus terbentuk dilakukan subkultur dengan memisahkan antara eksplan dengan kalus untuk memudahkan kalus berkembang dengan baik di dalam medium baru. Dua minggu kemudian pertumbuhan kalus sangat cepat. Ini terjadi pada semua perlakuan di atas terutama medium D10.

Semua kalus yang terbentuk pada awalnya bertekstur rapuh dan berwarna kuning, tetapi setelah 4 minggu terjadi perubahan warna kehijauan diikuti dengan pertumbuhan yang lambat. Hal ini juga diikuti dengan perubahan tekstur dari rapuh ke agak padat, sehingga subkultur sebaiknya dilakukan pada minggu ke 3 atau ke 4 untuk menghindari penuaan kalus dan kekurangan nutrisi di dalam medium (Gambar 2).



Gambar 1. Perlakuan yang berhasil membentuk kalus dari eksplan biji kenerak



Gambar 2. Pertumbuhan kalus biji setelah subkultur dalam medium MS D10 (5,0 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l BAP) menghasilkan kalus yang rapuh dan mudah berderai sesuai untuk kultur suspensi sel

Eksplan biji berhasil menginduksi kalus dengan kehadiran hormon 2,4-D pada konsentrasi 3,0 – 5,0 mg/l dan BAP 0,1 – 2,0 mg/l berbanding medium tanpa hormon atau rendah. Kalus mulai terbentuk pada bagian atas biji dan pada bagian yang terdedah pada medium yang berfungsi sebagai tempat penyerapan nutrisi ke dalam ekplan dan begitu juga dengan sifat BAP yang lebih cenderung dalam menghasilkan pucuk. Sehingga mendorong pada bagian atas terjadi pelembutan dinding sel biji terlebih dahulu kemudian kalus terbentuk. Konsentrasi hormon 2,4-D yang rendah yaitu 0 – 0,5mg/l akan merangsang perkecambahan biji (Mahadi, 2011). Ini membuktikan bahwa kombinasi antara hormon auksin dan sitokinin perlu bagi penginduksian kalus, namun dalam hal ini hormon 2,4-D lebih berperan (Sumaryono *et al.*, 2008).

Pembentukan Kalus pada Eksplan Daun

Pada eksplan daun yang memberikan respon hanya terjadi pada 5 kombinasi hormon yaitu medium MS E4 (0,5 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l BAP), E6 (2,0 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l BAP), E8 (3,0 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l BAP), E10 (5,0 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l BAP), dan G4 (0,5 mg/l 2,4-D + 2,0 mg/l BAP setelah 3-4 minggu pengkulturan dalam cahaya. Medium E10 lebih dulu membentuk kalus yaitu pada minggu ke 3 setelah pengkulturan, diikuti medium E4 dan E6 pada minggu ke 4, sedangkan medium G4 pada minggu ke 6. Pada medium lainnya, kalus tidak terbentuk dan kebanyakan warna eksplan berubah menjadi kecoklatan kemudian mati pada minggu ke 8 pengkulturan. Semua tekstur kalus yang terbentuk padat (Gambar 3).

Respon hormon mempengaruhi persentase pembentukan dan lebar kalus daun. Dari analisis varian, masing-masing medium menunjukkan perbedaan yang signifikan (Tabel 1). Medium E10 adalah yang terbaik, memberikan angka persentase pembentukan yang tertinggi yaitu 88% dengan rata-rata lebar kalus $13,1 \pm 0,3$ mm. Kalus mulai terbentuk pada minggu ke 6, tetapi pertumbuhan kalus daun sangat lambat sampai minggu ke 12. Pada minggu ke 16, kalus dalam medium E10 menunjukkan perkembangan lebih baik dari yang lainnya. Semua tekstur kalus yang terbentuk padat, hal ini yang menyebabkan pertumbuhan kalus lambat.

Menurut Anna Ling *et al.* (2007), pembentukan agregat yang padat dan tingginya intensitas fotosintesis yang berlangsung pada kalus daun akan menyebabkan dinding-dinding sel menebal dalam membentuk lignin, sehingga kalus menjadi cepat tua dengan berubah warna menjadi hijau. Dengan demikian pertumbuhan kalus daun akan lambat, sehingga perlu dilakukan subkultur. Muniran *et al.* (2008). menambahkan bahwa penuaan yang lebih awal dari suatu perkembangan kalus akibat pengaruh sifat dan karakteristik organ eksplan akan menunjukkan respon yang berbeda pada setiap eksplan tersebut.

Pembentukan Kalus pada eksplan Batang

Eksplan batang yang dikultur hanya berkembang membentuk kalus pada 6 kombinasi hormon yaitu

Medium MS D10 (5,0 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l BAP), E4 (0,5 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l BAP), E6 (2,0 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l BAP), E8 (3,0 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l BAP), E10 (5,0 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l BAP), dan G4 (0,5 mg/l 2,4-D + 2,0 mg/l BAP). Pada kombinasi lainnya terutama medium yang mengandung hormon 2,4-D yang rendah, kalus tidak terbentuk setelah 12 minggu pengkulturan (Tabel 1).

Pembentukan kalus dalam medium MS E8 dan E10 lebih cepat yaitu 2 minggu setelah pengkulturan dengan tekstur rapuh. Hasil ini menunjukkan perbedaan yang nyata berbanding pada medium lainnya. Pada medium D10, E4, E6 dan G4 dan pada minggu ke 3 dan 4, warna kalus yang terbentuk yaitu hijau muda dan bertekstur padat. Kalus eksplan batang mulai terbentuk pada kedua bagian potongan batang yang ditandai dengan pembengkakan terlebih dahulu. Pembengkakan ini terjadi 1 minggu setelah pengkulturan. Lebar kalus yang tertinggi pada medium MS E10 yaitu $20,2 \pm 2,9$ mm. Perihal hormon mempengaruhi pada persentase pembentukan dan lebar kalus, analisis varian menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$).

Pemisahan kalus untuk subkultur dilakukan setelah minggu ke 4 khususnya pada medium E8 dan E10 karena pertumbuhannya yang lebih cepat dibandingkan medium D10, E4, E6 dan G4 yang dilakukan pada minggu ke 8 (Gambar 3). Perihal yang terjadi pada eksplan hampir sama dengan eksplan daun. Pengurangan hormon 2,4-D menyebabkan kalus batang bertekstur padat dan cepat berubah menjadi hijau. Penggunaan batang muda yang mengandung sel-sel meristematik mempercepat pembelahan sel baru sehingga semakin tinggi kandungan hormon 2,4-D maka akan semakin cepat terjadi pembentukan kalus. Menurut Kramut dan Te-chato (2010), salah satu peranan hormon 2,4-D adalah membantu dalam proses pembelahan dan pemanjangan sel. Hormon ini masuk ke dalam kelompok hormon auksin. Hormon-hormon auksin sangat respon terhadap inisiasi pembentukan kalus pada kebanyakan jenis tanaman (Sakulrat dan Te-chato, 2008).



Gambar 3. Pertumbuhan kalus batang setelah subkultur dalam medium MS E10 ((5,0 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l BAP) menghasilkan kalus yang rapuh dan mudah berderai sesuai untuk kultur suspensi sel.

Tabel 1. Pembentukan Kalus dari Eksplan Kenerak (*G. umbrosus*)

Jenis Eksplan	Perlakuan (%)	Persentase Pembentukan (rata-rata)	Lebar kalus	Tekstur
Biji	D8	46,6 a	8,0 ± 1,0 a	Rapuh
	D10	66,6 a	22,8 ± 0,9 bc	Rapuh
	D11	53,3 a	14,6 ± 1,7 c	Rapuh
	E10	46,6 a	15,4 ± 2,2 d	Rapuh
Daun	E4	52 a	2,8 ± 1,1 a	Padat
	E6	60 b	5,6 ± 2,7 a	Padat
	E8	80 bc	11,7 ± 3,3 b	Padat
	E10	88 c	13,1 ± 0,3 b	Padat
	G4	44 d	4,5 ± 1,6 a	Padat
	Batang	D10	56 b	9,2 ± 1,9 a
E4		52 a	10,5 ± 0,5 a	Padat
E6		72 b	10,6 ± 0,6 b	Padat
E8		100 d	13,0 ± 1,2 bc	Rapuh
E10		88 c	20,2 ± 2,9 c	Rapuh
G4		52 a	7,8 ± 2,5 a	Padat
Akar	E4	40 a	3,2 ± 2,2 a	Padat
	E6	53,3 a	5,3 ± 1,7 ab	Padat
	E8	73,3 b	8,6 ± 2,2 c	Rapuh
	E10	60 b	9,0 ± 2,2 c	Rapuh

Keterangan: Angka yang diikuti oleh huruf yang sama berarti tidak berbeda nyata pada taraf 5%

Pembentukan Kalus pada Eksplan Akar

Pembentukan kalus eksplan akar terjadi setelah 2 minggu pengkulturan pada medium MS E4 (0,5 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l BAP), E6 (2,0 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l BAP), E8 (3,0 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l BAP) dan E10 (5,0 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l BAP), kombinasi lainnya tidak terbentuk kalus. Persentase pembentukan kalus yang terbaik pada medium E8 yaitu 73,3%, sedangkan lebar kalus pada medium E10. Ini berarti penginduksian kalus lebih baik pada medium E8 dan penggandaan kalus pada medium E10, seperti yang berlaku untuk eksplan batang.

Kalus akar mulai terbentuk ditandai dengan pembengkakan pada bagian eksplan yang dipotong setelah 1 minggu pengkulturan. Selanjutnya, pada minggu ke 2 kalus mulai terbentuk dan berkembang hingga minggu ke 4, kemudian kalus di subkultur ke dalam medium baru dengan memisahkan antara eksplan dengan kalus yang terbentuk. Perubahan warna terjadi pada minggu ke 8, dari kuning ke kehijauan. Ini mungkin disebabkan kandungan nutrisi semakin berkurang dan kalus menunjukkan ciri ketuaan. Menurut Garcia *et al.* (2011), berkurangnya kandungan nutrisi di dalam medium, membuat proses penuaan kalus yang lebih cepat, hal ini disebabkan sel-sel muda kekurangan bahan makanan yang akan digunakan oleh sel untuk membelah dan berkembang. Kurangnya nutrisi menyebabkan sel-sel yang sedang aktif berkembang akan mengurangi aktivitasnya, jika tidak segera disubkultur maka akan menyebabkan kematian pada sel (Janarthanam & Sumathi, 2010).

Secara keseluruhan eksplan hormon auksin terutama 2,4-D sangat berperan dalam penginduksian kalus karena sangat mampu merangsang penginduksian kalus dengan baik (Sakulrat dan Te-chato, 2008; Mahadi, 2011). Sedangkan hormon sitokinin terutama BAP tidak memainkan peranan penting dalam pembentukan kalus

tertapi dia berpengaruh pada produksi pucuk. Namun demikian, ada saatnya kombinasi hormon auksin dan sitokinin perlu hadir bersama dalam penginduksian kalus seperti kebanyakan pada kajian tumbuhan obatan (Maharajan *et al.*, 2010).

KESIMPULAN

Konsentrasi hormon yang diberikan pada medium semua eksplan kenerak (*G. umbrosus*) menunjukkan respon yang berbeda terhadap pembentukan kalus. Untuk eksplan biji, pembentukan dan lebar kalus yang terbaik adalah pada medium MS D10 (5,0 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l BAP) setelah 24 minggu pengkulturan, eksplan daun di dalam medium E10 (5,0 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l BAP) setelah 3 minggu pengkulturan, sedangkan untuk induksi kalus eksplan batang dan akar yaitu medium E8 ((3,0 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l BAP) setelah 2 minggu pengkulturan dan lebar kalus pada medium E10 ((5,0 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l BAP) setelah 3-6 minggu pengkulturan di dalam cahaya. Dari hasil di atas maka untuk inisiasi dan penggandaan kalus sebaiknya dalam medium E10, kecuali eksplan biji yaitu medium D10.

DAFTAR PUSTAKA

- Anna Ling, P. K., Huan, H. H & Hussein, S. 2007. Callus induction from leaf explants of *Melaleuca alternifolia*. *International Journal of Agricultural Research* 2 (3): 227-237.
- Azimahtol, H. L. P, Johson, S & Laily, D. 1998. Non-steroid receptor-mediated antiproliferative activity of styrylpyrone derivative in human breast cancer cell lines. *Anticancer Research* 18: 1739-1744.

- Garcia, R., Pacheco, G., Falcao, E., Borges, G & Mansur, E. 2011. Influence of type of explant, plant growth regulators, salt composition of basal medium and light on callogenesis and regeneration in *Passiflora suberosa* L. (Passifloraceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 106: 47-54.
- Janarthanam, B & Sumathi Sumathi, E. 2010. In vitro plant regeneration from shoot tip explants of *Exacum travancoricum* Beedi. *Plant Tissue Culture & Biotechnology* 20 (2) 113-118.
- Jewers, K, Dougan, J.B, Manchanda, A.H, Blunden, G, Kyi, A. & Wetchapinan, S. 1972. Goniotalamin and its distribution in four *Goniotalamus* species. *Phytochemistry* 11: 2025-2030.
- Kramut, P & Te-chato, S. 2010. Effect of culture media, plant growth regulators and carbon sources on establishment of somatic embryo in suspension culture of oil palm. *Journal of Agricultural Technology* 6 (1): 159-170.
- Mahadi, I. 2008. Produksi penggandaan pucuk (Multiple shoots) Kenerak (*Goniotalamus umbrosus* J. Sinclair) dengan menggunakan hormon kinetin dan BAP secara In vitro. *Dinamika Pertanian* 23: 34-36
- Mahadi, I. 2011. Pematangan dormansi biji Kenerak (*Goniotalamus umbrosus* J.Sinclair) menggunakan hormon 2,4-D dan BAP secara mikropropagasi. *SAGU. Agricultural Science And Technology Journal* 10: 20-23.
- Maharajan, M., Ahmed, A.B., Rosna Mat Taha., Jawahar, S., Ravi Paul, R & Jayaseelan, M. 2010. In vitro mass propagation from shoot tip explants of *Vernonia cinerea* (L.) Less. An antioxidant, anti inflammatory medicinal plant. *Plant Tissue Culture & Biotechnology*. 20 (2) 127-131.
- Muniran, F., Subhash, J. B & Farida, H. S. 2008. Micropropagation of *Elaeis guineensis* Jacq. 'Dura': Comparison of three basal media for efficient regeneration. *Indian Journal of Experimental biology* 46: 79-82.
- Sakulrat, S & Te-chato, S. 2008. Effect of genotypes of oil palm as indicator for speed of callus and embryogenic callus formation. *Journal of Agricultural Technology* 4 (2): 147-156.
- Saunders, R. M. K. 2003. A synopsis of *Goniotalamus* species (Annonaceae) in Peninsular Malaysia, with a description of a new species *Botanical Journal of the Linnean Society* 142: 321-339.
- Sujata, M., Parida, R., Sikha Singh., Joshi, R. K & Subudhi, E. 2011. Biochemical and molecular profiling of micropropagated and conventionally grown *Kaempferia galanga*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 106: 39-46.
- Sumaryono., Imron Riyadi., Pauline. D. K & Gale Ginting. 2008. Growth and differentiation of embryogenic callus and somatic embryo of Oil Palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) in temporary immersion system. *Indonesian Journal of Agriculture* 1 (2): 109-114.