

**INDUKSI KALUS EMBRIOGENIK DAN EMBRIO SOMATIK DARI EKSPLAN
DAUN KULIM (*Scorodocarpus borneensis* Becc.)**
*Embryogenic callus and somatic embryo induction from leaf explant of Kulim
(*Scorodocarpus borneensis* Becc.)*

Yelnititis

Kontributor Utama, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Hutan
Jl. Palagan Tentara Pelajar km 15, Purwobinangun, Pakem, Sleman, Yogyakarta, Indonesia
email penulis korespondensi : yelnititis@yahoo.com

Tanggal diterima: 29 September 2020, Tanggal direvisi: 29 September 2020, Disetujui terbit: 17 Desember 2020

ABSTRACT

Kulim is a multifunction woody plant for timber, spice, and medicine. Generative propagation of this plant is problematic due to limited seed. Using leaf segment explants through somatic embryogenesis are expected to provide seedlings vegetatively. The objective of this study was to obtain the best treatment for embryogenic callus induction that can develop to somatic embryo. The modified basal medium of Murashige and Skoog was used as the growth medium. The experiment was conducted in three stages: callus induction, embryogenic callus, and somatic embryo induction. The treatment of 2,4-D (3 – 12 mg/l) was used for callus induction. Embryogenic callus induction used 2,4-D (3 – 12 mg/l) combined with NAA 0,5 mg/l. Meanwhile, the treatment of Thidiazuron (0,1 – 0,7 mg/l) was used for somatic embryo induction. The result showed the best treatment of 2,4-D 6.0 mg/l for callus induction with compact texture, green, dry, and non-embryogenic. The combination of 2,4-D 12.0 mg/l with NAA 0.5 mg/l is the best treatment for friable callus induction. The treatment of 2,4-D 6.0 mg/l combined with NAA 0,5 mg/l is the best for embryogenic callus induction with a very friable texture, easy to separate, dry, smooth, and glossy. Thidiazuron of 0,1 mg/l is the best treatment for somatic embryo induction with an average of 7,8 somatic embryos

Keywords: *propagation, rare, thidiazuron*

ABSTRAK

Kulim merupakan tanaman berkayu berfungsi sebagai sumber kayu, obat dan bumbu masakan. Perbanyak generatif tanaman ini mengalami masalah keterbatasan biji. Penggunaan eksplan potongan daun melalui embriogenesis somatik diharapkan dapat digunakan untuk menyediakan bibit secara vegetatif. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan perlakuan terbaik untuk pembentukan kalus embriogenik yang dapat berkembang membentuk embrio somatik. Modifikasi medium dasar Murashige dan Skoog (MS) digunakan sebagai medium tumbuh. Penelitian dilakukan dalam tiga tahap kegiatan yaitu tahap induksi kalus, tahap induksi kalus embriogenik, dan embrio somatik. Pada tahap induksi kalus, perlakuan yang diberikan adalah penambahan 2,4-D dengan konsentrasi 3,0 – 12,0 mg/l. Pada tahap induksi kalus embriogenik diberikan perlakuan 2,4-D (3,0 – 12,0 mg/l) dikombinasikan dengan NAA 0,5 mg/l. Perlakuan yang diberikan untuk induksi embrio somatik thidiazuron 0,1 – 0,7 mg/l. Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan 2,4-D 6.0 mg/l merupakan perlakuan terbaik untuk induksi kalus dengan tekstur kompak, berwarna hijau, kering dan tidak embriogenik. Perlakuan kombinasi 2,4-D 12.0 mg/l dengan NAA 0,5 mg/l merupakan terbaik untuk induksi kalus friabel. Perlakuan 2,4-D 6,0 mg/l dikombinasikan dengan NAA 0,5 mg/l merupakan perlakuan terbaik untuk induksi kalus embriogenik dengan tekstur sangat friabel, mudah terpisah, kering, permukaan licin, bening, dan mengkilat. Perlakuan thidiazuron 0,1 mg/l merupakan perlakuan terbaik untuk induksi embrio somatik dengan jumlah rata-rata sebanyak 7,8 embrio.

Kata kunci: *perbanyak, langka, thidiazuron*

I. PENDAHULUAN

Kulim dengan nama latin *Scorodocarpus borneensis* (Becc.) merupakan jenis penghasil kayu yang saat ini populasinya sudah menurun sangat cepat. Pohon kulim tumbuh di dataran rendah dan kering yang hanya dijumpai di Pulau

Sumatera dan Kalimantan. Semua bagian tanaman kulim dapat dimanfaatkan, kayunya digunakan sebagai bahan bangunan, lantai, papan dan balok jembatan (Martawijaya, et al, 1989). Buahnya digunakan untuk bumbu masakan dan obat cacing serta daun yang muda digunakan sebagai sayuran. Dalam Simanjuntak

dan Kartika, (2017) dinyatakan bahwa daun kulim digunakan sebagai obat diare karena mengandung senyawa metil tiometil sulfide. Selanjutnya dalam Kartika, Barus, Surbakti, dan Simanjuntak, (2014) juga dilaporkan bahwa kulit batang dan daun serta buah kulim mengandung beberapa senyawa sesquiterpene dan alkaloid scorodocarpin A – C yang mempunyai struktur kimia alkaloid triptamin.

Eksplotasi pohon kulim yang terjadi beberapa tahun terakhir menyebabkan jenis ini terancam punah. Menurut Heriyanto dan Garsetiasih, (2004), beberapa faktor yang menjadi penyebab terancamnya keberadaan pohon kulim adalah faktor manusia, hama dan faktor fisiologis dari tanaman itu sendiri. Faktor manusia mencakup eksploitasi yang berlebihan yang tidak diikuti dengan regenerasinya, konversi hutan untuk lahan sawit dan pengambilan buah untuk bumbu masak dan obat menjadi faktor utama. Buah yang jatuh dari pohon induk dimakan oleh binatang liar seperti babi hutan dan kancil serta binatang lain menjadi penyebab lain berkurangnya permudaan kulim di habitat alamnya. Dan secara fisiologi pohon kulim mempunyai pertumbuhan yang lambat.

Secara alami kulim diperbanyak dengan menggunakan biji tetapi buah yang jatuh dari pohon sedikit sekali yang dapat berkecambah karena sebelum mengalami perkecambahan buah kulim sudah dimakan binatang liar. Pengambilan buah kulim dari pohon induk mengalami kendala karena tingginya bebas cabang pohon yang menyulitkan proses pengunduhan. Upaya perbanyak kulim secara vegetatif makro seperti stek dan cangkok maupun secara mikro melalui kultur jaringan juga belum banyak dilaporkan. Penggunaan kultur jaringan diharapkan dapat menjadi suatu metode perbanyak dari sumber tanaman yang terbatas. Kausar, Nazir, dan Hinagul, (2018) menyatakan bahwa perbanyak mikro merupakan teknik yang cocok untuk perbanyak tanaman yang beresiko tinggi dalam perbanyak skala massal, reforestasi dan

persilangan konvensional. Selanjutnya Slazak et al., (2014) menyatakan bahwa perbanyak tanaman secara *in vitro* merupakan cara yang baik untuk konservasi tanaman yang keberadaannya terancam (*endangered*).

Perbanyak *in vitro* dapat dilakukan melalui pembentukan tunas lateral dan melalui embriogenesis somatik. Embriogenesis somatik merupakan salah satu teknik yang akhir-akhir ini menjadi alternatif untuk perbanyak tanaman. Melalui teknik ini, embrio somatik dapat dihasilkan secara langsung dan secara tidak langsung tanpa melalui fusi gamet. Embrio somatik yang terbentuk secara tidak langsung terjadi melalui fase antara, yaitu dengan membentuk kalus dan kembali menjadi meristematik dari sel yang diferensiasi (Santos & Paz, 2016). Kalus embriogenik yang dapat berkembang secara bertahap merupakan komponen yang penting pada tahap embriogenesis somatik tidak langsung.

Keberhasilan embriogenesis somatik dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain zat pengatur tumbuh (ZPT) yang digunakan. ZPT 2,4-D merupakan salah satu hormon tumbuh dari kelompok auksin yang banyak digunakan dalam induksi kalus dan kalus embriogenik. Kalus merupakan massa sel yang tidak terorganisasi dan tidak terdiferensiasi sedangkan kalus embriogenik merupakan kalus yang dapat berkembang membentuk embrio somatik. Pada konsentrasi tinggi, 2,4-D akan merangsang kalus dan pertumbuhan eksplan embrio dan kotiledon pada tanaman mindi (Kaviani, 2014). Auksin berfungsi dalam proses pembelahan sel tetapi menghambat diferensiasi pada tanaman dikotil. Pancaningtyas, (2015) melaporkan bahwa keseimbangan konsentrasi auksin dan sitokinin yang ada dalam jaringan merangsang terbentuknya kalus embriogenik. Wattimena, (1988) menyatakan bahwa 2,4-D adalah ZPT yang umum digunakan untuk induksi embrio somatik. Selain 2,4-D, penggunaan thidiazuron telah banyak dilakukan untuk induksi embrio somatik pada beberapa jenis tanaman. Asghar et al., (2013) melaporkan bahwa thidiazuron selalu

diklasifikasikan sebagai sitokinin sintetik yang menyebabkan banyak perubahan fisiologis.

Penelitian bertujuan untuk mendapatkan perlakuan terbaik untuk induksi kalus embriogenik dan induksi embrio somatik dari eksplan potongan daun kulim.

II. BAHAN DAN METODE

A. Waktu dan lokasi penelitian

Sumber eksplan berupa anakan kulim diambil dari Bukit Suligi, Rokanhulu, Riau pada bulan Oktober 2012. Anakan kulim yang diperoleh sebanyak 16 batang ditanam dalam polibag dan dipelihara di persemaian. Kegiatan penelitian dilaksanakan pada bulan April 2017 sampai bulan Juni 2018 di Laboratorium Kultur Jaringan Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Hutan, Yogyakarta.

B. Bahan dan metode

1. Bahan

Daun ke-tiga dari pucuk anakan kulim yang ada di persemaian digunakan sebagai bahan tanaman dalam penelitian ini. Bahan kimia dari media dasar Murashige dan Skoog (MS) yang terdiri dari hara makro, mikro yang ditambah dengan vitamin dan agar digunakan sebagai media tumbuh. Zat pengatur tumbuh yang digunakan terdiri dari 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D), NAA dan thidiazuron.

2. Alat

Alat yang digunakan di lapangan adalah parang, cangkul, pisau, *cutter*, plastik besar dan tali. Peralatan yang digunakan di persemaian terdiri dari polibag, plastik bening dan paranet. Alat yang digunakan di laboratorium merupakan alat-alat yang umum dalam kegiatan kultur jaringan, alat-alat gelas dan alat pemotong.

3. Prosedur kerja

Tahapan sterilisasi eksplan. Daun ke-tiga dari anakan kulim yang ada di persemaian dipotong, dicuci dan dibersihkan dengan sabun

cair lalu dibilas dengan air bersih, selanjutnya direndam dalam 0,1% larutan fungisida antracol selama 10 menit dan dibilas dengan air sampai bersih. Daun yang sudah dibersihkan kemudian disterilisasi di dalam laminar air flow (LAF) dengan menggunakan alkohol 70% selama 5 menit, HgCl₂ selama 3 menit dan bayclin 10% selama 10 menit. Setiap tahap sterilan diikuti dengan pembilasan dengan air steril sampai bersih. Penelitian dilakukan dalam tiga tahap kegiatan yaitu tahap induksi kalus, tahap induksi kalus embriogenik dan tahap induksi embrio somatik.

a) Induksi kalus

Daun yang sudah disterilisasi dipotong-potong dengan ukuran 1×1 cm dan selanjutnya ditumbuhkan pada media perlakuan yang sudah disiapkan. Perlakuan yang diberikan adalah penambahan ZPT :

- i. 2,4-D 3,0 mg/l
- ii. 2,4-D 6,0 mg/l
- iii. 2,4-D 12,0 mg/l

Masing-masing perlakuan terdiri dari 10 botol dan setiap botol berisi 1 eksplan. Setiap perlakuan diulang sebanyak tiga kali. Pengamatan dilakukan terhadap respon pertumbuhan (waktu induksi kalus, tekstur kalus) dan visual kalus terbentuk.

b) Induksi kalus embriogenik

Subkultur kalus hasil induksi dilakukan secara berulang pada perlakuan yang sama dikombinasikan dengan NAA untuk mendapatkan kalus friabel dan embriogenik. Subkultur dilakukan setiap delapan minggu selama empat puluh minggu pada media perlakuan kombinasi :

- i. 2,4-D 3,0 mg/l + NAA 0,5 mg/l
- ii. 2,4-D 6,0 mg/l + NAA 0,5 mg/l
- iii. 2,4-D 12,0 mg/l + NAA 0,5 mg/l

c) Induksi embrio somatik

Kalus friabel dan embriogenik yang diperoleh pada tahap induksi kalus embriogenik dipotong-potong dengan ukuran 1×1 cm dan dijadikan sebagai eksplan. Eksplan

ditumbuhkan pada media dasar MS yang sudah dimodifikasi dengan perlakuan :

- i. thidiazuron 0,1 mg/l
- ii. thidiazuron 0,3 mg/l
- iii. thidiazuron 0,5 mg/l
- iv. thidiazuron 0,7 mg/l

Pengamatan dilakukan setiap 8 minggu selama 64 minggu. Parameter yang diamati meliputi warna kalus, tekstur kalus dan embrio somatik yang diperoleh. Rancangan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap (RAL) dengan tiga kali ulangan. Setiap ulangan terdiri dari 10 botol dan setiap botol berisi 1 eksplan. Data hasil penelitian dianalisa dengan analisis sidik ragam dan apabila terdapat perbedaan dilanjutkan dengan uji DMR. Data kualitatif yang diperoleh dianalisis secara deskriptif.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Induksi kalus

Pada penelitian ini, kalus dapat dihasilkan dari semua perlakuan konsentrasi 2,4-D yang digunakan. ZPT 2,4-D banyak digunakan untuk induksi kalus dan induksi kalus embriogenik yang dapat berkembang menjadi embrio somatik. ZPT 2,4-D berfungsi dalam merangsang pembelahan sel, mengontrol pemanjangan sel dan menjadikan sel membentuk embrio (Santos & Paz, 2016). Eksplan potongan daun kulim yang ditumbuhkan pada perlakuan 2,4-D dengan konsentrasi 3,0 mg/l – 12 mg/l memberikan respon yang cukup lama. Hal ini diduga disebabkan oleh adanya lapisan lilin yang terdapat pada permukaan eksplan daun sehingga penyerapan nutrisi dari media tumbuh terhambat. Ribeiro et al. (2015) melaporkan bahwa penggunaan 2,4-D pada eksplan daun *Hovenia dulcis* yang dikulturkan tidak menghasilkan kalus.

Penebalan yang diikuti dengan pembesaran eksplan terjadi pada bagian bekas potongan eksplan merupakan respon pertama yang dapat diamati pada penelitian ini. Menurut

Rusdianto dan Indrianto, (2012) penebalan eksplan terjadi sebagai hasil interaksi antara eksplan dengan medium, zat pengatur tumbuh dan kondisi lingkungan selama waktu inkubasi. Penebalan eksplan mulai terjadi pada minggu ke-enam sampai minggu ke-sepuluh setelah ditanam. Pada eksplan daun *Fraxinus nigra* penebalan dan pembesaran eksplan terjadi lebih cepat yaitu pada minggu ke-empat setelah ditanam (Lee & Pijut, 2017).

Dari tiga konsentrasi 2,4-D yang digunakan dalam penelitian ini, penggunaan 2,4-D 6,0 mg/l merupakan konsentrasi yang paling cepat memberikan respon yaitu pada minggu ke-enam diikuti perlakuan 2,4-D 12 mg/l pada minggu ke-tujuh. Sedangkan respon paling lambat dihasilkan dari perlakuan 3,0 mg/l 2,4-D yaitu pada minggu ke-sepuluh. Setiap bagian tanaman mempunyai kandungan hormon endogen yang berbeda-beda, sehingga membutuhkan jenis dengan konsentrasi zat pengatur tumbuh yang berbeda untuk pertumbuhannya. Berbeda dengan penelitian Jhankare, et al, (2011) yang melaporkan bahwa respon pertama dari eksplan yang dikulturkan terjadi pada minggu pertama dan umumnya tidak tergantung pada jenis eksplan dan media tumbuh.

Eksplan yang menebal dan menjadi lebih besar serta melengkung sehingga sebagian eksplan tidak menyentuh media. Induksi kalus pertama terjadi pada bagian eksplan yang menyentuh media pada minggu ke-delapan dan secara perlahan kalus berkembang dan menutupi seluruh bagian eksplan. Menurut Santos dan Paz, (2016) pembentukan kalus tergantung pada keseimbangan antara hormon endogen dan auksin yang ditambahkan secara eksogen. Selanjutnya induksi kalus dari eksplan daun kluwek (Prabakti, Restanto, & Avivi, 2017), pasak bumi (Hussein, et al, 2005) dan eksplan hipokotil dan kotiledon kulim (Abeyratne et al., 1991) terjadi pada minggu ke-dua setelah ditanam.

Pada penelitian ini kalus yang dihasilkan dari semua perlakuan 2,4-D mempunyai tekstur

kompak, berwarna hijau, agak kering dan tidak berpotensi embriogenik. Hal ini didukung oleh pernyataan Devendra, Srinivas, dan Reddy, (2011) bahwa 2,4-D, NAA dan BAP secara tunggal tidak berkompeten membentuk kalus untuk menghasilkan embrio somatik, namun pada beberapa spesies 2,4-D lebih sering digunakan sebagai ZPT tunggal untuk menghasilkan kalus embriogenik. Dari penelitian Andre et al., (2015) pada tanaman *Lippia multiflora* dilaporkan bahwa penggunaan 2,4-D pada media induksi dihasilkan kalus friabel, berair dan berwarna kekuningan.

Tabel 1. Persentase pembentukan kalus dengan perlakuan 2,4-D

| Perlakuan (mg/l) | % pembentukan kalus |
|------------------|---------------------|
| MS + 2,4-D 3,0 | 30c |
| MS + 2,4-D 6,0 | 74a |
| MS + 2,4-D 12,0 | 64b |

Keterangan : Angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom tidak berbeda nyata pada taraf 5 % uji DMR.

MS : Murashige dan Skoog;
2,4-D : 2,4-Dicholophenoxi acetic acid

Tingkat pembentukan kalus pada penelitian ini berbeda-beda tergantung pada perlakuan konsentrasi 2,4-D yang digunakan. Pada perlakuan 2,4-D 3,0 mg/l dihasilkan rata-rata persentase eksplan yang membentuk kalus paling rendah yaitu sebanyak 30% sedangkan rata-rata persentase pembentukan kalus paling tinggi diperoleh dari perlakuan 2,4-D 6,0 mg/l yaitu sebanyak 74% (Tabel 1) dan menurun pada perlakuan 2,4-D 12,0 mg/l. Walaupun secara teori masing-masing dan setiap sel somatik suatu tanaman adalah totipoten tetapi frekuensi induksi kalus dan regenerasi dari satu sel dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti spesies/jenis tanaman, sumber eksplan dan kondisi kultur seperti jenis dan konsentrasi ZPT yang digunakan (Abeyratne et al., 1991; Jhankare et al., 2011; Kaviani, 2014). Sedangkan Sherkar dan Chavan, (2014)

menyatakan bahwa perlakuan 2,4-D 3,0 mg/l sangat efektif untuk induksi kalus dari eksplan potongan daun dan ruas tanaman tomat asal kultur *in vitro*.

Sebaliknya Hussein et al., (2005) melaporkan bahwa penggunaan 2,4-D pada konsentrasi rendah tidak dapat merangsang pembentukan kalus dari eksplan daun pasak bumi.

B. Induksi kalus embriogenik

Kalus embriogenik merupakan kalus yang berpotensi berkembang membentuk embrio somatik. Terbentuknya kalus embriogenik dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain media dan zat pengatur tumbuh. Menurut Oetami (2015) terbentuknya kalus embriogenik merupakan tanda keberhasilan induksi kalus dalam embrogenesis somatik tidak langsung (pembentukan embrio somatik melalui fase kalus).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan kombinasi zat pengatur tumbuh NAA dan 2,4-D memberikan pengaruh terhadap pembentukan kalus yang bersifat kompak antara lain dicirikan tidak mudah dipisahkan dan umumnya berwarna hijau. Pada subkultur kalus pertama (SK1) kalus friabel yang terbentuk masih dalam jumlah yang terbatas. Kalus friabel umumnya tumbuh pada bagian permukaan eksplan kalus kompak dengan jumlah yang berbeda tergantung pada perlakuan yang digunakan. Disamping itu warnanya juga bervariasi dari hijau dan hijau kekuningan. Kalus friabel yang paling banyak, diperoleh dari perlakuan 2,4-D 12,0mg/l + NAA 0,5 mg/l sedangkan kalus friabel yang paling sedikit diperoleh dari perlakuan 2,4-D 3,0 mg/l + NAA 0,5 mg/l. Hal ini menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ZPT 2,4-D yang digunakan (dari 3,0 mg/l sampai 12,0 mg/l) semakin cepat terjadinya pembelahan sel sehingga jumlah kalus yang dihasilkan semakin banyak.

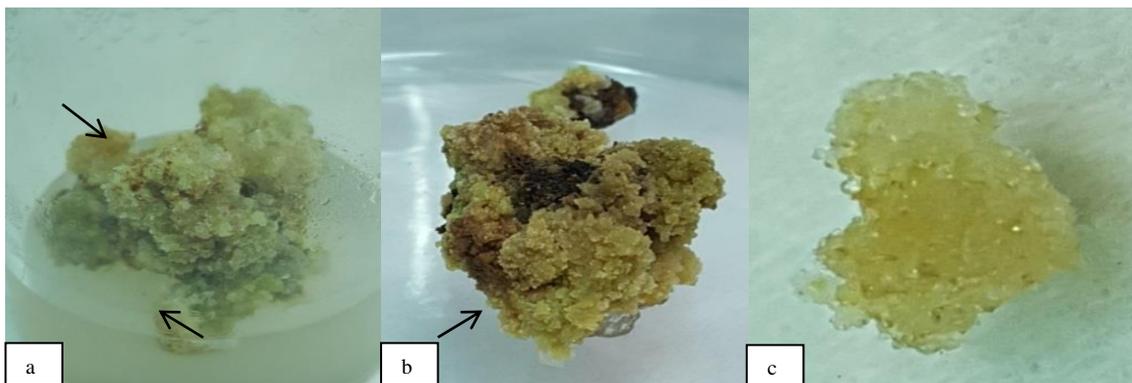
Pada tahap selanjutnya kalus friabel dipisahkan dari eksplan kalus kompak dan disubkultur ulang pada perlakuan yang sama

sampai semua kalus yang terbentuk mempunyai tekstur friabel. Pada tahap subkultur ke-empat, kalus friabel yang dihasilkan pada semua perlakuan mencapai 100 %. Kalus friabel yang dihasilkan mempunyai warna yang bervariasi yaitu hijau muda, kuning muda dan putih (Gambar 1a) tergantung dari perlakuan yang digunakan. Dari perlakuan 2,4-D 3,0 mg/l + NAA 0,5 mg/l umumnya dihasilkan kalus friabel berwarna hijau sedangkan dari perlakuan 2,4-D 6,0 mg/l dan 12,0 mg/l + NAA 0,5 mg/l dihasilkan kalus friabel berwarna kuning kehijauan, kuning muda dan putih (Gambar 1b).

Pada tahap subkultur ke-lima, pada perlakuan 2,4-D 6,0 mg/l dan 12,0 mg/l + NAA 0,5 mg/l dihasilkan kalus friabel berwarna kuning muda, cerah dan putih bening (Gambar 1c) dan berpotensi embriogenik, sedangkan dari perlakuan kombinasi 2,4-D 3,0 mg/l + NAA 0,5 mg/l hanya dihasilkan kalus friabel tetapi tidak berpotensi embriogenik. Kalus embriogenik mempunyai warna yang bervariasi tergantung pada jenis tanaman, tipe eksplan, media tumbuh,

jenis dan konsentrasi ZPT yang digunakan. Pancaningtyas, (2015) menyatakan bahwa pembentukan kalus embriogenik sangat dipengaruhi oleh interaksi antara perlakuan auksin dan posisi eksplan. Kalus embriogenik sering dicirikan dengan warna kalus yang terbentuk; pada wortel, kalus embriogenik berwarna putih kekuningan (Rusdianto & Indrianto, 2012); pada *Shorea pinanga* berwarna kuning muda (Yelnititis, 2013) dan pada rotan tohiti berwarna putih bening (Yelnititis, 2018).

Kalus embriogenik yang dihasilkan pada penelitian ini mempunyai tekstur sangat friabel dan mudah terpisah, tidak banyak air, permukaannya licin, bening, mengkilat dan sel-selnya berukuran kecil (Gambar 1c) serta tingkat pertumbuhan yang relatif cepat. Menurut Quiroz-Figueroa et al. (2002) daerah embriogenik dibentuk dari lapisan sel sub epidermal yang sangat aktif membelah secara mitosis melalui pembelahan sel dan proliferasi sel yang cepat.



Gambar 1. Kalus friabel hijau (a), kalus embriogenik hijau kekuningan (b) dan kalus embriogenik putih bening dan putih kekuningan (c)

C. Induksi embrio somatik

Dalam prosesnya embrio somatik dapat terjadi secara langsung maupun tidak langsung tergantung pada jenis tanaman, tipe eksplan, jenis dan konsentrasi ZPT yang digunakan. Pada embriogenesis somatik langsung, embrio somatik terbentuk langsung dari eksplan yang ditumbuhkan tanpa didahului dengan pembentukan kalus, sedangkan pada embriogenesis somatik tidak langsung,

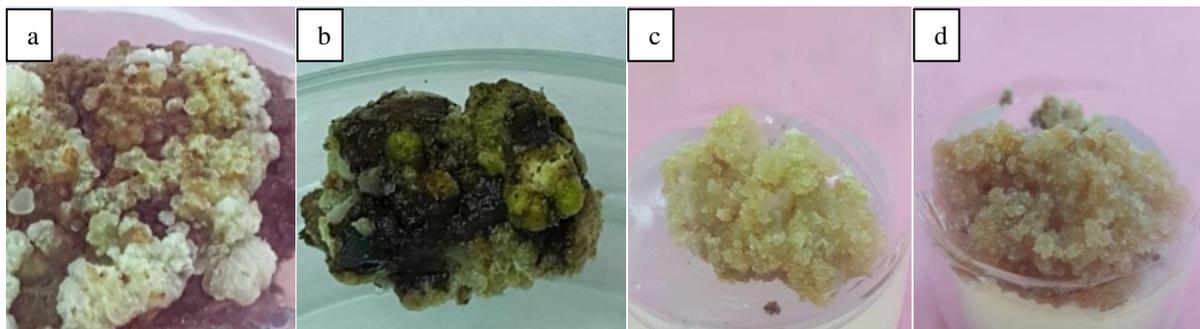
pembentukan embrio somatik diawali dengan terbentuknya kalus yang selanjutnya mengalami beberapa tahap perkembangan (Quiroz-Figueroa et al., 2002). Menurut Quiroz-Figueroa et al. (2006), teknik embriogenesis somatik memegang peranan penting dalam propagasi klon. Selanjutnya Smertenko dan Bozhkov, (2014) melaporkan bahwa embrio somatik berasal dari satu sel tunggal atau sekelompok sel

dengan morfologi dan latar belakang genetik yang sama pada respon terhadap rangsangan lingkungan yang dihasilkan oleh jaringan disekitarnya pada media kultur.

Pada penelitian ini penambahan thidiazuron dengan konsentrasi 0,1 mg/l – 0,7 mg/l ke dalam media tumbuh memberikan pengaruh terhadap kalus embriogenik yang ditumbuhkan. Embrio somatik hanya diperoleh dari perlakuan thidiazuron rendah (0,1 mg/l dan 0,3 mg/l). Menurut Lema-Ruminska dan Niedojadlo, (2014), embriogenesis somatik dipengaruhi oleh kondisi kultur seperti ZPT tanaman. Dari pengamatan yang dilakukan, kalus embriogenik mulai memperlihatkan perubahan bentuk dan warna setelah dikulturkan selama empat minggu. Pada bagian permukaan kalus embriogenik terbentuk struktur yang berkembang menjadi embrio somatik globular dengan ukuran yang berbeda. Perbedaan ini diduga disebabkan karena konsentrasi dan kemampuan jaringan kalus embriogenik dalam menyerap ZPT yang ditambahkan ke dalam

media tumbuh. Hal yang sama dinyatakan oleh Rathore et al. (2016) bahwa perbedaan respon dari eksplan kalus embriogenik dapat disebabkan oleh sitokinin berbeda, penyerapan berbeda, beberapa pengaruh proses metabolik dan kemampuan untuk mengubah tingkat sitokinin endogen.

Dari empat konsentrasi thidiazuron yang digunakan, dua perlakuan diantaranya dapat menginduksi embrio somatik yaitu perlakuan thidiazuron 0,1 mg/l dan 0,3 mg/l. Embrio somatik globular yang dihasilkan dari perlakuan thidiazuron 0,1 mg/l umumnya berukuran kecil, lebih banyak dan berkelompok (Gambar 2a). Sedangkan embrio somatik dari perlakuan thidiazuron 0,3 mg/l sedikit dan terpisah satu sama lain (Gambar 2b). Penggunaan thidiazuron dengan konsentrasi lebih dari 0,3 mg/l tidak memperlihatkan adanya pembentukan embrio somatik tetapi lebih merangsang pertumbuhan kalus yang lebih cepat sehingga ukuran kalus bertambah besar (Gambar 2c dan d).



Gambar 2. a. Embrio somatik globular dari perlakuan thidiazuron (a). 0,1 mg/l.;(b). thidiazuron 0,3; kalus embriogenik dari perlakuan thidiazuron (c). 0, 5 mg/l dan d. 0,7 mg/l (d)

Penggunaan ZPT thidiazuron dengan konsentrasi yang lebih tinggi dapat mengubah keseimbangan kandungan ZPT endogen yang berpengaruh pada tingkat pertumbuhan kalus. Menurut Guo et al., (2011) thidiazuron dapat meningkatkan aktifitas auksin endogen. Meningkatnya kandungan auksin dibanding sitokinin di dalam jaringan tanaman yang dikulturkan akan merangsang induksi kalus. Sedangkan Ouyang et al., (2016) menyatakan bahwa peningkatan penggunaan thidiazuron dari 5 μ M menjadi 25 μ M (1,1 mg/l menjadi 5,5

mg/l) pada tanaman *Metabriggsia ovalifolia* disertai dengan peningkatan jumlah embrio somatik yang dihasilkan. Demikian juga dengan Asghar et al., (2013) yang melaporkan bahwa penggunaan thidiazuron dengan konsentrasi diatas 0,8 mg/l menekan induksi embrio somatik dari eksplan kotiledon tanaman *Myrica rubra* Sieb. & Zucc.

IV. KESIMPULAN

Persentase induksi kalus terbentuk pada perlakuan 6.0 mg/l 2,4-D. Kalus embriogenik

dihasilkan dari perlakuan 2,4-D 6,0 mg/l dan 12,0 mg/l dikombinasikan dengan NAA 0,5 mg/l. Perlakuan terbaik untuk induksi embrio somatik globular adalah thidiazuron 0,1 mg/l.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada saudara Suprihati dan Rudi Hartono yang telah ikut membantu dalam pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Abeyratne, W. M., Bandara, D. C., & Senanayake, Y. D. A. (1991). In Vitro Propagation of Nadun (*Pericopsis mooniana*) Through Callus Culture. *Tropical Agricultural Research*, 3, 242–252.
- André, S. B., Mongomaké, K., Modeste, K. K., Edmond, K. K., Tchoa, K., Hilaire, K. T., & Justin, K. Y. (2015). Effects of plant growth regulators and carbohydrates on callus induction and proliferation from leaf explant of *Lippia multiflora* Moldenke (*Verbenaceae*). *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, 8(2), 118–127.
- Asghar, S., Abbas, S. J., Wahab, F., Khan, N. H., Ahmad, N., Chen, L., He, X., & Qin, Y. (2013). Direct induction of somatic embryogenesis and plant regeneration from cotyledon explants of *Myrica rubra*. *African Journal of Agricultural Research*, 8(2), 216–223. <https://doi.org/10.5897/AJAR10.1159>
- Devendra, B. N., Srinivas, N., & Reddy, A. S. (2011). High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration in nodal explant cultures of *Eclipta alba* L. Hassk. *Annals of Biological Research*, 2(3), 143–149.
- Guo, B., Abbasi, B. H., Zeb, A., Xu, L. L., & Wei, Y. H. (2011). Thidiazuron: A multi-dimensional plant growth regulator. *African Journal of Biotechnology*, 10(45), 8984–9000.
- Heriyanto, N. M., & Garsetiasih, R. (2004). Potensi pohon kulim (*Scorodocarpus borneensis* Becc.) di kelompok hutan Gelawan Kampar, Riau. *Buletin Plasma Nutfah*, 10(1), 37–42.
- Hussein, S., Ibrahim, R., Kiong, A. L. P., Fadzillah, N. M., & Daud, S. K. (2005). Micropropagation of *Eurycoma longifolia* Jack via formation of somatic embryogenesis. *Asian Journal of Plant Sciences*, 4(5), 472–485. <https://doi.org/10.3923/ajps.2005.472.485>
- Jhankare, A., Tiwari, G., Tripathi, M. K., Baghel, B. S. and, & Tiwari, S. (2011). Plant regeneration from mature cotyledon , embryo and hypocotyl explants of *Withania somnifera* (L.) Dunal . *Journal of Agricultural Technology*, 7(4), 1023–1035.
- Kartika, R., Barus, T., Surbakti, R., & Simanjuntak, P. (2014). Structure characterization of alkaloid *Scorodocarpines* derivative from fruits on *Scorodocarpus borneensis* Becc. (Olacaceae). *Asian Journal of Chemistry*, 26(18), 6047–6049.
- Kausar, R., Nazir, A. and, & Hinagul. (2018). In-vitro conservation of multipurpose tree species of genus *Acacia*. *Academia Journal of Biotechnology*, 6(4), 80–89. <https://doi.org/10.15413/ajb.2018.0110>
- Kaviani, B. (2014). The Effect of 2 , 4-D on callus induction of *Melia azedarach* L . *Thai Journal of Agricultural Science*, 47(2), 71–75.
- Lee, J. H., & Pijut, P. M. (2017). Adventitious shoot regeneration from in vitro leaf explants of *Fraxinus nigra*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 130, 335–343. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1228-1>
- Lema-Ruminska, J., & Niedojadlo, J. (2014). Somatic embryogenesis in leaf explants of *chrysanthemum radiomutants* of the ' lady ' group. *Propagation of Ornamental Plants*, 14(4), 177–183.
- Martawijaya, A., Kartasujana, I., Kadir, K., & Prawira, S. A. (1981). *Atlas Kayu Indonesia* (I). Balitbang
- Oetami, R. F. (2015). Kombinasi embrio genesis somatik langsung dan tidak langsung pada perbanyakan kopi robusta. *Warta Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia*, 27(2), 1–5.
- Ouyang, Y., Chen, Y., Lu, J., Silva, J. A. T. da, Zhang, X., & Ma, G. (2016). Somatic embryogenesis and enhanced shoot organogenesis in *Metabriggsia ovalifolia* W.T. Wang. *Scientific Reports*, 6, 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep24662>
- Pancaningtyas, S. (2015). Effect of 2 , 4 dichlorophenoxy acetic acid on in vitro callogenesis of cocoa (*Theobroma cacao* L .). *Pelita Perkebunan*, 31(2), 90–98.
- Prabakti, H. D., Restanto, D. P., & Avivi, S. (2017). Pengaruh macam eksplan dan konsentrasi 2,4-D terhadap induksi kalus kluwek (

- Pangium edule* Reinw.) secara *in vitro*. *Gontor Agrotech Science Journal*, 3(2), 39–58. <https://doi.org/10.21111/agrotech>.
- Quiroz-Figueroa, F. R., Fuentes-Cerda, C. F. J., Rojas-Herrera, R., & Loyola-Vargas, V. M. (2002). Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis systems of *Coffea arabica*. *Plant Cell Reports*, 20, 1141–1142. <https://doi.org/10.1007/s00299-002-0464-x>
- Quiroz-figueroa, F. R., Rojas-Herrera, R., Galaz-Avalos, R. M., & Loyola-Vargas, V. M. (2006). Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 86, 285–301. <https://doi.org/10.1007/s11240-006-9139-6>
- Rathore, M. S., Mastan, S. G., Yadav, P., Bhatt, V. D., Shekhawat, N. S., & Chikara, J. (2016). South African Journal of Botany Shoot regeneration from leaf explants of *Withania coagulans* (Stocks) Dunal and genetic stability evaluation of regenerates with RAPD and ISSR markers. *South African Journal of Botany*, 102, 12–17. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2015.08.003>
- Ribeiro, I. G., Gayer, C. R. M., de Castro, T. C., Coelho, Marsen, G. P., & Albarello, N. (2015). Compact callus cultures and evaluation of the antioxidant activity of *Hovenia dulcis* Thunb. (Rhamnaceae) under in vivo and in vitro culture conditions. *Journal of Medicinal Plants Research*, 9(1), 8–15. <https://doi.org/10.5897/jmpr2014.5622>
- Rusdianto, & Indrianto, A. (2012). Induksi kalus embriogenik pada wortel (*Daucus carota* L.). *Jurnal Bionature*, 13(2), 136–140.
- Santos, M. R. A. dos, & Paz, E. S. (2016). Effect of 2,4-D on callus induction in leaf explants of peach palm (*Bactris gasipaes* H.B.K.). *International Journal of Current Research*, 8(09), 38688–38691.
- Sherkar, H. D., & Chavan, A. M. (2014). Effect of 2,4-D; BAP and TDZ on callus induction and shoot regeneration in potato. *Science Research Reporter*, 4(1), 101–105.
- Simanjuntak, P., & Kartika, R. (2017). Studi kimia tumbuhan obat tradisional asal Kalimantan Timur “bawang hutan”, *Scorodocarpus borneensis* Becc ”: suatu tinjauan pustaka. *Prosiding Seminar Nasional Kimia*, 1–6.
- Slazak, B., Sliwinska, E., Saługa, M., Ronikier, M., Bujak, J., Slomka, A., Goransson, U., & Kuta, E. (2014). Micropropagation of *Viola uliginosa* (Violaceae) for endangered species conservation and for somaclonal variation-enhanced cyclotide biosynthesis Micropropagation of *Viola uliginosa* (Violaceae) for endangered species conservation and for somaclonal var. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, August. <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0592-3>
- Smertenko, A., & Bozhkov, P. V. (2014). Somatic embryogenesis: life and death processes during apical – basal patterning. *Journal of Experimental Botany*, 65(5), 1343–1360. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru005>
- Wattimena, G. A. (1988). *Teknik kultur jaringan*. Institut Pertanian Bogor.
- Yelnititis. (2013). Induksi embrio somatik *Shorea pinanga* Scheff. pada kondisi fisik media berbeda. *Jurnal Pemuliaan Tanaman Hutan*, 7(2), 73–84.
- Yelnititis. (2018). Embriogenesis somatik rotan tohiti (*Calamus inops* Becc. ex Heyne). *Jurnal Pemuliaan Tanaman Hutan*, 12(1), 41–50.

