

KULTUR KALUS TANAMAN OBAT CIPLUKAN (*Physalis angulata* L.)

CALLUS CULTURE OF MEDICINAL PLANTS CIPLUKAN (*Physalis angulata* L.)

Retno Mastuti^{1)*}, Wahyu Widoretno¹⁾, Nunung Harijati¹⁾

Diterima: 22 April 2020

Disetujui: 15 Mei 2020

Afiliasi Penulis:

¹⁾ Jurusan Biologi, Fakultas
Matematika dan Ilmu
Pengetahuan Alam, Universitas
Brawijaya

Alamat Korespondensi:

* mastuti7@ub.ac.id

ABSTRAK

Ciplukan (*Physalis angulata* L.) merupakan anggota famili Solanaceae yang telah lama dimanfaatkan sebagai tanaman obat. Penyediaan tanaman obat yang umumnya tumbuh liar dan belum banyak dibudidayakan ini telah diupayakan melalui propagasi tanaman secara *in vitro*. Kultur kalus banyak dilaporkan berpotensi sebagai alternatif sumber metabolit sekunder termasuk yang berkhasit obat. Penelitian ini bertujuan untuk optimasi inisiasi dan pemeliharaan kultur kalus *P. angulata* menggunakan eksplan kotiledon dan hipokotil kecambah *in vitro*. Kalus diinduksi pada medium MS ditambah Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) BAP 0,5 dan 2 mg/l yang masing-masing dikombinasikan dengan 2,4-D 1, 2, dan 4 mg/l dan IAA 0,05 , 0,5 dan 1,0 mg/l. Secara umum kedua eksplan kotiledon maupun hipokotil menunjukkan respon proliferasi yang baik terhadap kombinasi ZPT yang diujikan. Jenis eksplan tidak berpengaruh nyata pada kemampuan pembentukan kalus pada semua (100%) bagian jaringan eksplan dan berat basah (BB) kalus primer maupun sekunder. Berat basah kalus primer maupun sekunder lebih dipengaruhi oleh kombinasi ZPT. Subkultur kalus primer pada medium pemeliharaan dengan kombinasi BAP (0,5 dan 1 mg/l) + IAA / 2,4-D 0,2 mg/l tidak hanya menghasilkan kalus sekunder tetapi juga menghasilkan tunas dan akar. Kombinasi BAP 2 mg/l + 2,4-D (1, 2 dan 4 mg/l) dapat mempertahankan pertumbuhan kalus sekunder tanpa mengalami organogenesis. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kultur kalus dapat dihasilkan secara optimal baik dengan eksplan hipokotil maupun kotiledon *in vitro* pada medium induksi dan pemeliharaan yang sama yaitu MS + BAP 2 mg/l + 2,4-D (1, 2 dan 4 mg/l).

Kata Kunci: eksplan, friabel, hipokotil, *in vitro*, kotiledon

ABSTRACT

Ciplukan (*Physalis angulata* L.) is a member of the Solanaceae family which has long been used as a medicinal plant. Provision of medicinal plants that generally grow wild and have not been widely cultivated has been attempted through propagation of plants *in vitro*. Callus culture has been reported as a potential alternative source of secondary metabolites, including those with medicinal properties. This study aims to optimize the initiation and maintenance of *P. angulata* callus culture using cotyledonary explants and hypocotyl sprouts *in vitro*. Callus was induced on MS medium supplemented with Plant Growth Regulator (PGR), namely BAP 0.5 and 2 mg / l, each combined with 2,4-D 1, 2, and 4 mg / l and IAA 0.05, 0.5 and 1.0 mg / l. In general, both cotyledon and hypocotyl explants showed a good proliferation response to the ZPT combination tested. The type of explant had no significant effect on the ability of callus formation in all (100%) parts of explant tissue and fresh weight (FW) of primary and secondary callus. The primary and secondary callus FW was more influenced by the combination of PGR. Primary callus subculture on maintenance medium with a combination of BAP (0.5 and 1 mg / l) + IAA / 2,4-D 0.2 mg / l not only produced secondary callus but also produced shoots and roots. The combination of BAP 2 mg / l + 2,4-D (1, 2 and 4 mg / l) can maintain secondary callus growth without undergoing organogenesis. The results of this study indicate that callus culture can be produced optimally both from hypocotyl

Cara Sitosi:

Mastuti, R., W. Widoretno, N. Harijati. 2020. Kultur kalus tanaman obat ciplukan (*Physalis angulata* L.). *Biotropika: Journal of Tropical Biology* 8 (1): 26-35.

and cotyledons explants in vitro on the same induction and maintenance medium, namely MS + BAP 2 mg /l + 2,4-D (1, 2 and 4 mg /l).

Keywords: explan, friable, hypocotyl, in vitro, cotyledon

PENDAHULUAN

Kalus merupakan sekumpulan massa sel yang aktif membelah, tidak terorganisir, dan belum terdiferensiasi. Secara alami kalus terbentuk sebagai respon perbaikan terhadap kondisi stress seperti pelukaan dan infeksi patogen [1]. Pada kondisi artifisial *in vitro* penambahan kombinasi hormon eksogen dapat memperpanjang proses pembelahan sel hingga menghasilkan massa kalus yang banyak. Apabila massa kalus telah mampu dihasilkan dari sepotong kecil jaringan induknya maka lingkungan tumbuh *in vitro* dapat dimodifikasi untuk meningkatkan akumulasi produk senyawa metabolit sekunder yang juga akan bermanfaat dalam mengurangi eksplorasi dan resiko kepunahan suatu spesies tanaman dari habitat aslinya [2, 3]. Teknik kultur jaringan, melalui kultur kalus dan kultur suspensi sel telah banyak digunakan untuk produksi senyawa metabolit sekunder [4, 5, 6, 7]. Ketersediaan kultur sel dan jaringan secara berkelanjutan dapat menjadi solusi senyawa sekunder yang hanya diproduksi pada struktur dan jaringan yang spesifik dan fase pertumbuhan tertentu [8]. Manipulasi kultur kalus dapat meningkatkan kandungan senyawa metabolit sekunder yang bernilai komersial baik secara kuantitatif maupun kualitatif [9, 10]. Kultur kalus yang dimodifikasi secara genetik dapat digunakan untuk sintesis metabolit sekunder bioaktif dan untuk regenerasi tanaman dengan daya tahan yang lebih baik terhadap stres garam, angin, penyakit, dan hama [11]. Pembentukan kalus dipengaruhi oleh jenis eksplan dan kombinasi Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) pada medium kultur. Tipe eksplan yang berbeda akan memberikan respon yang berbeda terhadap kecepatan pembentukan dan pertumbuhan serta perkembangan kalus [12, 13]. Oleh karena itu untuk pengembangan kultur kalus diperlukan medium kultur yang paling sesuai untuk jenis eksplan tertentu.

Ciplukan (*Physalis angulata* L.) merupakan tanaman herba tahunan anggota famili Solanaceae yang telah lama dimanfaatkan sebagai obat tradisional.

Ciplukan banyak mengandung senyawa metabolit sekunder antara lain *withanolide*, *physalin*, *calystegine*, dan alkaloid tropan nortropan [14]. Hasil penelitian *in vitro* maupun *in vivo* menunjukkan bahwa senyawa kimia yang terkandung pada tanaman ciplukan memiliki aktivitas antara lain sebagai, antibakteri [15, 16], antiinflamatori, analgesik dan antipiretik [17]. Beberapa senyawa telah diisolasi dari *P. angulata* dan telah dilakukan karakterisasi secara kimia. Senyawa *physalin* dari kelompok steroid ditemukan pada daun dan batang *P. angulata* [18].

Pada genus *Physalis* induksi kalus telah diteliti pada *P. minima* [19, 20, 21], *P. peruviana* [22], *P. angulata* [23], dan *P. pubescens* [24]. Pertumbuhan kalus *in vitro* terbaik pada *P. pubescens* diperoleh dari eksplan *in vitro* batang dan petiol pada medium MS + NAA 0,5 mg/l + BAP 0,5 mg/l dan MS + NAA 0,25 mg/l + 0,5 mg/l [24]. Kultur kalus *P. angulata* telah dilaporkan berhasil diinduksi dari eksplan hipokotil kecambah *in vitro* pada medium MS dengan penambahan beberapa kombinasi sitokin (BAP dan kinetin) dan auksin (2,4-D, IBA dan IAA) [23]. Penambahan 2,4-D mampu menginduksi pembentukan kalus pada potongan eksplan hipokotil paling banyak, yaitu >80% bagian. Kalus yang dihasilkan pada medium dengan penambahan 2,4-D memiliki berat basah (BB) paling tinggi tetapi sampai minggu keempat setelah kultur hanya mencapai sekitar 0,5 g. Oleh karena itu, upaya penyediaan kalus *P. angulata* secara optimal dan berkelanjutan masih perlu dilakukan untuk mendukung perbanyak / penyediaan bibit berkualitas secara massal maupun untuk manipulasi produksi senyawa metabolit sekunder. Penelitian ini bertujuan untuk optimasi induksi dan produksi kalus dari eksplan hipokotil dan kotiledon *P. angulata* *in vitro* pada beberapa kombinasi ZPT terutama BAP dengan 2,4-D atau IAA.

METODE PENELITIAN

Persiapan sumber eksplan. Biji diperoleh dari buah masak tanaman ciplukan

yang tumbuh liar di ladang jagung di daerah Malang Selatan. Setelah dikeringanginkan, kemudian biji disterilisasi dengan larutan kloroks 20% selama 15 menit dan dibilas dengan akuades steril selama lima menit sebanyak tiga kali. Biji yang telah disterilisasi dikecambahkan pada medium agar tanpa penambahan komponen makro dan mikro nutrien maupun ZPT. Satu minggu setelah perkecambahan bagian hipokotil dan kotiledon kecambah dapat digunakan untuk eksplan induksi kalus.

Pengaruh jenis eksplan dan variasi kombinasi ZPT pada induksi kalus. Eksplan kotiledon utuh dan hipokotil sepanjang \pm 0,5 cm yang dipotong tepat di bawah percabangan kotiledon kecambah *in vitro* diinokulasi pada medium MS + kombinasi auksin:sitokinin yang ditambah gula pasir 3%, dan dipadatkan dengan agar komersial 10%. Zat pengatur tumbuh yang diujikan adalah BAP 0,5 dan 2 mg/l yang masing-masing dikombinasikan dengan 2,4-D (1, 2, dan 4 mg/l) dan IAA (0,05, 0,5, dan 1,0 mg/l). Eksplan kotiledon utuh diinokulasikan pada medium dengan sisi abaksial menghadap ke permukaan medium agar sedangkan eksplan hipokotil diletakkan di atas medium secara horizontal. Setiap jenis eksplan dikultur dalam 10 botol dan setiap botol kultur diisi tiga buah eksplan untuk masing-masing jenis. Selanjutnya semua kultur diinkubasi pada suhu $24\pm2^{\circ}\text{C}$ dengan kelembaban relatif 60-65% dan pencahayaan secara terus-menerus pada intensitas sekitar 600 lux yang diberikan oleh cahaya fluoresen putih. Kalus primer yang memiliki morfologi dan respon pertumbuhan yang baik disubkultur pada medium pemeliharaan yaitu a) medium dengan penambahan BAP 0,5 dan 1,0 mg/l yang masing-masing dikombinasikan dengan IAA dan 2,4-D 0,2 mg/l, dan b) medium yang menghasilkan respon terbaik untuk induksi kalus.

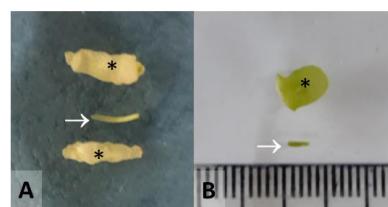
Parameter induksi dan pertumbuhan kalus. Kecepatan induksi kalus dan perubahan morfologi dalam proses dediferensiasi dan persentase eksplan yang membentuk kalus diamati setiap hari sampai umur kultur tiga minggu. Friabilitas dan warna kalus juga diamati seiring dengan perkembangan massa kalus. Berat basah kalus primer ditimbang pada umur kultur empat minggu sedangkan BB kalus sekunder ditimbang setiap minggu selama tiga minggu.

Analisis data. Respon pembentukan kalus dianalisis secara deskriptif. Analisis komparasi data kuantitatif dilakukan dengan One-way ANOVA ($P<0,05$). Uji lanjutan menggunakan Tukey HSD pada taraf 5% menggunakan software SPSS 24.0.

HASIL DAN PEMBAHASAN

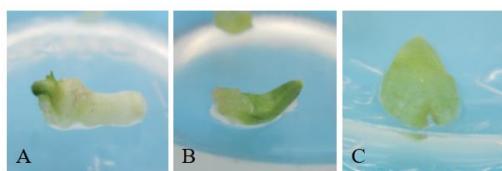
Induksi kalus. Eksplan hipokotil dan kotiledon kecambah ciplukan *in vitro* umur satu minggu menunjukkan respon pembentukan kalus primer yang baik pada semua kombinasi ZPT yang diujikan. Kalus primer adalah kalus yang dihasilkan pada jaringan eksplan [25]. Proliferasi sel secara aktif ditandai dengan peningkatan ukuran eksplan kotiledon maupun hipokotil yang mulai tampak pada hari ketiga setelah kultur. Potongan eksplan hipokotil yang awalnya berwarna hijau muda keputihan dengan BB $< 0,01$ g dan diameter $\pm 0,5$ mm mulai tampak membengkak dan menebal serta berwarna putih keruh. Eksplan kotiledon yang berukuran 3-4 mm mulai tampak memanjang, melebar dan menebal dengan warna hijau yang bervariasi, yaitu hijau keputihan, hijau muda jernih dan hijau tua.

Satu minggu setelah kultur, indikasi terjadinya proses dediferensiasi pada kedua jenis eksplan semakin jelas yang ditunjukkan dari peningkatan ukuran. Eksplan hipokotil mulai menunjukkan massa kalus yang terbentuk pada kedua ujung potongan atau bahkan pada seluruh potongan hipokotil (Gambar 1A). Sedangkan dediferensiasi dan proliferasi pada eksplan kotiledon juga ditunjukkan dengan peningkatan ukuran yang signifikan (Gambar 1B).



Gambar 1. Perubahan morfologi eksplan pada tahap induksi kalus satu minggu setelah kultur. A eksplan hipokotil, B. eksplan kotiledon. Keterangan: *: jaringan hipokotil atau kotiledon yang telah mengalami dediferensiasi dan proliferasi sel, →: eksplan pada saat awal kultur di medium induksi kalus.

Pada kultur umur dua minggu semua eksplan hipokotil tetap mengalami proliferasi aktif yang ditunjukkan dengan ukuran yang semakin bertambah (Tabel 1). Pada medium BAP 2 mg/l eksplan hipokotil mengalami pembengkakan lebih tebal pada dibanding pada medium BAP 0,5 mg/l. Kombinasi BAP 2 mg/l + IAA menghasilkan pembengkakan eksplan lebih tebal dibanding kombinasi BAP + 2,4-D (Gambar 2A). Pembengkakan semakin tebal seiring dengan peningkatan konsentrasi IAA. Respon yang sama juga ditunjukkan eksplan kotiledon. Secara umum tingkat proliferasi sel lebih baik pada medium BAP 2 mg/l (Gambar 2B-C). Jenis auksin IAA menginduksi proliferasi lebih baik dibanding 2,4-D (data tidak dipublikasikan).

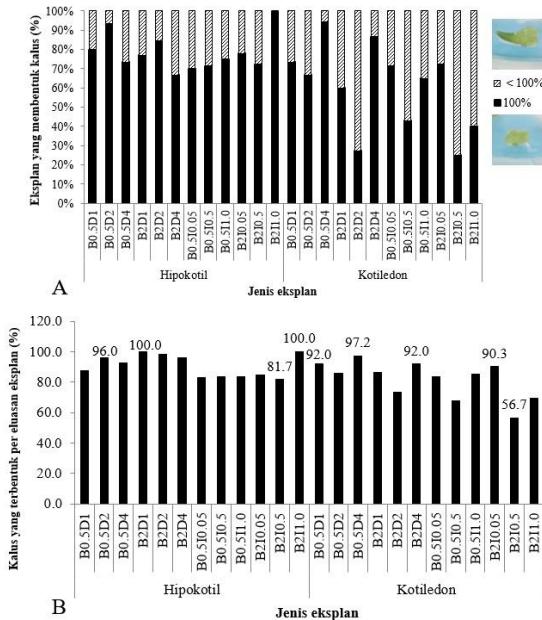


Gambar 2. Inisiasi kalus dua minggu setelah kultur. A. Pembengkakan / penebalan seluruh jaringan eksplan hipokotil, B. Pembentukan kalus pada bagian pangkal eksplan kotiledon yang sudah membesar, C. Dediferensiasi pada seluruh jaringan eksplan kotiledon.

Kultur kalus dapat diperoleh melalui dua tahap, yaitu induksi dan proliferasi. Tahap induksi melibatkan dediferensiasi yang merupakan proses perubahan sitologi maupun morfologi sel dewasa menjadi sel yang bersifat meristematis kembali. Aktivitas proliferasi secara aktif mengakibatkan peningkatan jumlah sel sehingga jaringan induk terlihat menjadi lebih tebal dan membesar atau membengkak. Proliferasi aktif ini umumnya terjadi sebagai respon cepat perbaikan terhadap pelukaan pada jaringan. Ketersediaan hormon eksogen dan endogen yang sesuai akan memicu pembelahan secara berkelanjutan dan meregulasi terbentuknya massa kalus yang tidak terorganisasi (amorf) [26]. Jaringan kalus merupakan sekumpulan massa sel parenkim yang berdinding tipis yang dapat tersusun renggang (remah) atau rapat (kompak) satu sama lain. Kombinasi auksin dan sitokinin pada medium dapat mempengaruhi kecepatan pembentukan kalus. Selain itu tipe jaringan

eksplan yang berbeda juga berpengaruh pada intensitas kalus yang terbentuk [27].

Pada umur kultur tiga minggu kedua jenis eksplan pada seluruh kombinasi ZPT menunjukkan perbedaan kisaran persentase pembentukan kalus. Pembentukan kalus pada 100% eksplan hipokotil berkisar antara 66,67 – 100% sedangkan pada eksplan kotiledon antara 25 – 94,44%. Medium BAP 2 mg/l + 2,4-D 4 mg/l menunjukkan pembentukan kalus 100% paling sedikit (66,67%) (Gambar 3A) sedangkan BAP 0,5 mg/l + 2,4-D 2 mg/L dan BAP 2 mg/l + IAA 1,0 mg/l menunjukkan pembentukan kalus 100% yang lebih banyak, masing-masing sebanyak 93,33% dan 100%. Sedangkan eksplan kotiledon yang telah menghasilkan kalus 100% berkisar antara 25 – 94,44%. Berdasarkan individu eksplan, jaringan hipokotil juga relatif lebih responsif dalam proses dediferensiasi sel untuk induksi kalus dibanding eksplan kotiledon (Gambar 3B). Hasil ini ditunjukkan dengan bagian potongan eksplan hipokotil yang menghasilkan kalus berkisar antara 81,67 – 100% sedangkan pada eksplan kotiledon berkisar antara 56,7 – 97,2%.



Gambar 3. Respon pembentukan kalus pada dua jenis eksplan *P. angulata* pada umur kultur tiga minggu. A. Persentase ulangan eksplan yang menghasilkan kalus dari seluruh ulangan. B. Persentase bagian individu eksplan yang mengalami dediferensiasi menghasilkan kalus. B= BAP, D= 2,4-D.

Tabel 1. Morfologi perkembangan eksplan hipokotil dan kotiledon pada beberapa medium induksi kalus empat minggu setelah kultur

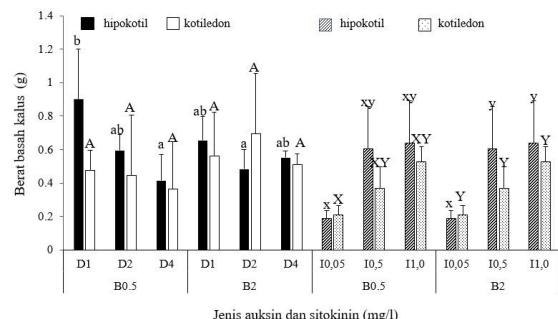
No	Kombinasi ZPT (mg/L)			Morfologi / tekstur kalus pada dua jenis eksplan hipokotil					
	BAP	2,4-D	IAA	kotiledon		tekstur	kalus	organogenesis	tekstur
1		1	-	+	tunas & akar	Hijau kompak	++	Tunas & akar	hijau keputihan kompak / kekuningan friabel
2	0,5	2	-	+	akar +++		+++	tunas	friabel kuning / hijau kompak
3		4	-	+	akar	sebagian menjadi coklat	+	tunas	hijau kompak / friabel kuning bagian bawah kecoklatan;
4		1	-	++	-	hijau kompak	+++	-	hijau friabel / hijau keputihan kompak
5		2	-	+++	-	hijau kompak	++	nodul tunas	hijau friabel dan kompak hijau keputihan
6	2	4	-	++	-	kompak hijau agak kekuningan	++	-	hijau friabel dan kompak hijau keputihan
7		0,05	+	-			+	tunas	hijau friabel
8	0,5	-	0,5	+	tunas	hijau kompak	++	tunas	kompak, hijau keputihan bagian bawah kecoklatan
9		-	1,0	+	-	hijau kompak	+	tunas	kompak, hijau keputihan bagian bawah kecoklatan
10		-	0,05	+	tunas	hijau keputihan	kalus pada salah satu ujung hipokotil	tunas	kompak hijau keputihan
11	2	-	0,5	+	tunas	hijau keputihan, kompak	+	-	friabel hijau kekuningan dan kompak
12		-	1,0	+	-	kebanyakan kompak, sebagian kecil friabel	+	-	kompak /friabel hijau kekuningan

Empat minggu setelah kultur eksplan hipokotil dan kotiledon masing-masing mengalami perkembangan morfologi yang bervariasi (Tabel 1). Kalus umumnya berwarna hijau, kompak maupun remah (friabel). Dari semua kombinasi ZPT hanya medium BAP 2 mg/l + 2,4-D yang hanya menghasilkan kalus primer saja tanpa menghasilkan organogenesis. Perkembangan ini hanya terjadi pada eksplan hipokotil.

Hasil analisis varian menunjukkan bahwa BB kalus dipengaruhi oleh interaksi sitokinin (BA) dan auksin (2,4-D atau IAA) (Gambar 4). Berat basah kalus tidak dipengaruhi oleh jenis eksplan. Pada medium kombinasi BAP + 2,4-D BB kalus yang dihasilkan eksplan kotiledon tidak berbeda nyata. Eksplan hipokotil menghasilkan BB kalus tertinggi pada media BAP 0,5 mg/l + 2,4-D 1 mg/l ($0,9 \pm 0,3$ g) yang berbeda nyata dengan BB kalus pada media BAP 0,5 mg/l + 2,4-D 4 mg/l ($0,4 \pm 0,16$ g) dan BAP 2 mg/l + 2,4-D 2 mg/l ($0,5 \pm 0,12$ g). Berat basah kalus paling rendah cenderung dihasilkan medium BAP 0,5 mg/l + IAA 0,05 mg/l dan BAP 0,5 mg/l + IAA 0,05 mg/l pada eksplan hipokotil maupun kotiledon. Berat basah kalus yang dihasilkan eksplan

hipokotil dan kotiledon pada kedua jenis medium tersebut, masing-masing hanya mencapai $0,19 \pm 0,05$ mg/l dan $0,21 \pm 0,05$ mg/l.

Zat pengatur tumbuh 2,4-D diketahui sebagai auksin sintetik utama yang berpengaruh signifikan pada kallogenesis [28]. Tetapi untuk menginduksi pertumbuhan kalus dari tanaman dikotil sering ditambahkan sitokinin. IAA adalah salah satu hormon auksin yang banyak digunakan untuk induksi pertumbuhan akar *in vitro* [29]. Kombinasi IAA dengan BAP dapat menghasilkan induksi kalus *in vitro* maksimum pada eksplan batang *Citrullus colocynthis* bila ditambahkan 2,4-D [30].



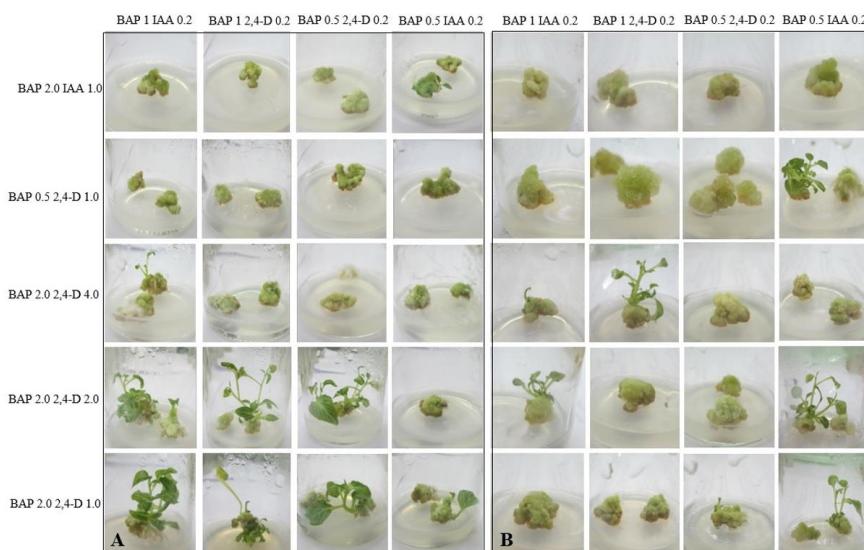
Gambar 4. Berat basah jaringan eksplan yang mengalami dediferensiasi empat minggu setelah kultur. Keterangan: B= BAP, D=2,4-D, I=IAA. Huruf yang sama pada jenis eksplan yang sama dan jenis auksin yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata ($\alpha=0,05$).

Berdasarkan hasil pengamatan deskriptif (Tabel 1) dan data pertumbuhan secara kuantitatif (Gambar 4) dapat disimpulkan bahwa eksplan hipokotil kecambah *in vitro* ciplukan berpotensi menghasilkan kalus primer tanpa organogenesis apabila dikultur pada medium dengan penambahan kombinasi BAP dan 2,4-D. Berdasarkan respon perkembangan morfologi (Tabel 1) dan pertumbuhan (Gambar 4) yang dihasilkan maka kalus primer hasil induksi pada lima medium induksi kalus (BAP 2 mg/l + IAA 1 mg/l; BAP 0,5 mg/l + 2,4-D 1 mg/l; dan BAP 2 mg/l + 2,4-D 1, 2, dan 4 mg/l) selanjutnya disubkultur pada empat jenis medium pemeliharaan kalus, yaitu kombinasi BAP 0,5 dan 1,0 mg/l yang masing-masing

dikombinasikan dengan IAA dan 2,4-D 0,2 mg/l.

Pemeliharaan kalus. Empat minggu setelah subkultur umumnya semua medium pemeliharaan menghasilkan kalus sekunder kompak putih/kehijauan (Tabel 2). Kalus primer dari eksplan hipokotil mampu mempertahankan pertumbuhan kalusnya walaupun organogenesis baik tunas maupun akar juga muncul pada banyak medium pemeliharaan (Gambar 5A). Kalus primer dari eksplan hipokotil pada medium BAP 2 mg/l + 2,4-D 1 mg/l atau 2 mg/l setelah disubkultur ke medium pemeliharaan menghasilkan pertumbuhan tunas (Tabel 2; Gambar 5A). Eksplan kotiledon tampak lebih dominan dalam menghasilkan kalus sekunder (Gambar 5B) tetapi organogenesis juga terjadi pada beberapa medium pemeliharaan.

Hasil ini menunjukkan bahwa empat medium pemeliharaan yang diujikan yaitu kombinasi BAP 0,5 atau 1 mg/l dengan 2,4-D 2 mg/l atau IAA 2 mg/l kurang mampu mempertahankan pertumbuhan kalus. Oleh karena itu, kalus primer disubkultur ke medium pemeliharaan dengan komposisi ZPT yang sama dengan medium induksi kalus, yaitu BAP 2 mg/l dikombinasikan dengan 2,4-D 1, 2, dan 4 mg/l.



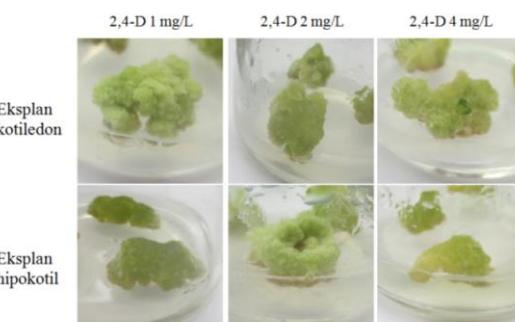
Gambar 5. Morfologi kalus pada medium pemeliharaan kalus. A eksplan hipokotil, B. Eksplan kotiledon. Keterangan: lajur paling kiri adalah medium induksi kalus; baris paling atas adalah medium pemeliharaan.

Tabel 2. Deskripsi morfo-organogenesis eksplan kotiledon dan hipokotil pada medium pemeliharaan empat minggu setelah subkultur

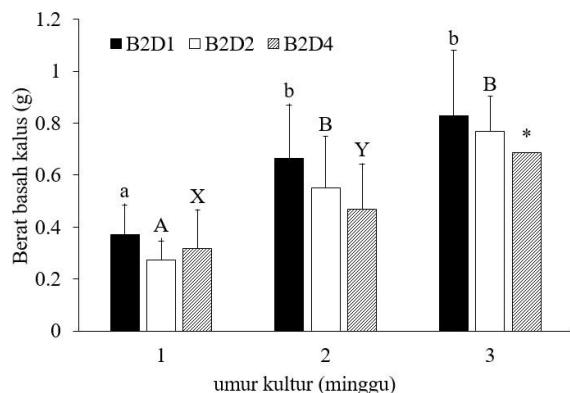
HIPOKOTIL					KOTILEDON				
No	Mediu m asal	BAP1 IAA 0,2	BAP1 2,4-D 0,2	BAP0,5 IAA 0,2	BAP0,5 2,4-D 0,2	BAP1 IAA 0,2	BAP1 2,4-D 0,2	BAP0,5 IAA 0,2	BAP0,5 2,4-D 0,2
1	BAP 2 IAA 1	kalus kompak kehijauan	kalus kompak keputih an/keku ningan	kalus kompak kehijauan kalus; muncul akar	kalus kompak keputih an ; muncul akar*	Kontami nasi	kalus kompak keputih an/keku ningan	kalus kompak kehijauan	kalus kompak keputihan; muncul tunas* & akar*
2	BAP 0,5 2,4-D 1	kalus kompak hijau ; muncul akar*	kalus kompak hijau ; muncul akar *	kalus kompak hijau ; muncul akar** & tunas	kalus kompak hijau; muncul akar** &	kalus kompak kehijauan	kalus kompak kehijauan	kalus kompak kehijauan	kalus kompak kehijauan
3	BAP 2 2,4-D 4	kalus kompak kehijauan ; muncul tunas**	kalus kompak putih kehijauan ; muncul tunas*	kalus kompak kehijauan	kalus kompak keputih an; muncul tunas**	kalus hijau keputih an; muncul akar** & tunas	kalus hijau keputih an; muncul akar** & tunas	kalus hijau gelap akar**	kalus hijau keputihan; muncul akar**
4	BAP 2 2,4-D 2	tunas + akar – pertum buhan tunas sangat dominan	tunas + akar – pertum buhan planlet + akar	akar – pertum buhan akar dominan	tunas + akar – pertum buhan planlet + akar	kalus kompak hijau keputih an planlet + akar	kalus hijau keputih an kompak , tunas	kalus hijau keputih an kompak , tunas	kalus kompak hijau kekuningan
5	BAP 2 2,4-D 1	tunas + akar – pertum buhan planlet tinggi	tunas + akar - aplikasi tunas	tunas + akar – pertum buhan planlet/tun as daun melebar	tunas + akar – pertum buhan planlet/tun as daun tinggi	kalus hijau keputih an + tunas	kalus hijau keputih an	kalus hijau keputih an + akar*	kalus hijau keputihan + akar*

Dua minggu setelah subkultur umumnya kalus sekunder dapat mempertahankan pertumbuhan kalus hijau kompak/friabel pada ketiga medium (Gambar 6). Hasil analisis sidik ragam menunjukkan bahwa penambahan BB kalus selama tiga minggu dipengaruhi secara nyata oleh jenis medium (Gambar 7). Kalus primer dari eksplan hipokotil maupun kotiledon pada tiga jenis medium pemeliharaan mengalami peningkatan BB selama tiga minggu kultur. Berat basah kalus sekunder pada medium dengan penambahan 2,4-D 1, 2 dan 4 mg/l meningkat signifikan sampai minggu kedua setelah subkultur, masing-masing mencapai $0,67 \pm 0,21$; $0,55 \pm 0,20$ dan $0,45 \pm 0,17$ g. Pada minggu selanjutnya BB masih cenderung bertambah tetapi tidak signifikan (Gambar 7). Hal ini berbeda dengan hasil kultur kalus sebelumnya yang sampai

pada minggu keempat hanya mencapai $BB \pm 0,5$ g [23].



Gambar 6. Morfologi kalus pada umur kultur tiga minggu di medium MS + BAP 2 mg/l kombinasi dengan 2,4-D (1, 2, dan 4 mg/l).



Gambar 7. Respon pertumbuhan kalus selama tiga minggu pada medium MS + BAP (2 mg/l) + 2,4-D (1, 2, 4 mg/l). A. eksplan hipokotil, B. eksplan kotiledon. Huruf yang sama pada setiap jenis medium menunjukkan tidak berbeda nyata ($\alpha=0,05$). B= BAP, D= 2,4-D. tanda *: kultur mengalami kontaminasi.

Induksi proses dediferensiasi dipengaruhi oleh hormon endogen dan ZPT eksogen pada medium nutrisi. Peran penting pada induksi dediferensiasi ditentukan oleh jenis dan konsentrasi ZPT serta interaksinya [31]. Kombinasi antara auksin dan sitokinin pada medium induksi maupun pemeliharaan kalus menentukan intensitas pembentukan kalus [27].

KESIMPULAN

Eksplan hipokotil dan kotiledon kecambah *P. angulata* *in vitro* mampu menghasilkan kalus dengan intensitas berbeda pada semua variasi kombinasi sitokinin dan auksin. Eksplan yang diinduksi pada medium dengan penambahan kombinasi ZPT BAP (2 mg/l) dan 2,4-D (1, 2 dan 4 mg/l) mampu meningkatkan BB kalus sekunder tanpa diiringi munculnya tunas maupun akar.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh dana DIPA Universitas Brawijaya berdasarkan surat perjanjian No. 5/UN10.F09.01/PN/2018.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Ikeuchi M, Sugimoto K, Iwase A (2013) Plant callus: Mechanisms of induction and repression. *Plant Cell* 25(9): 3159–3173. doi: 10.1105/tpc.113.116053.
- [2] Yue W, Ming QL, Lin B, Rahman K, Zheng CJ, Han T, Qin LP (2016) Medicinal plant cell suspension cultures: Pharmaceutical applications and high-yielding strategies for the desired secondary metabolites. *Critical Reviews in Biotechnology* 36:215-232. doi: 10.3109/07388551.2014.923986.
- [3] Chandana BC, Kumari NHC, Heena MS, Shashikala S K, Lakshmana D (2018) Role of plant tissue culture in micropropagation, secondary metabolites production, and conservation of some endangered medicinal crops. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* SP3:246-251.
- [4] Murthy HN, Lee EJ, Paek KY (2014) Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: Strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 118:1-16. doi: 10.1007/s11240-014-0467-7.
- [5] Isah T, Umar S, Mujib A, Sharma MP, Rajasekharan PE, Zafar N, Frukh A (2018) Secondary metabolism of pharmaceuticals in the plant *in vitro* cultures: Strategies, approaches, and limitations to achieving higher yield. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 2018;132:239-265. doi: 10.1007/s11240-017-1332-2.
- [6] Cardoso JC, Oliveira MEBS, Cardoso FCI (2019) Advances and challenges on the *in vitro* production of secondary metabolites from medicinal plants. *Horticultura Brasileira* 37: 124-132. doi: 10.1590/s 0102-053620190201.
- [7] Janarthanam B, Gopalakrishnan M, Sekar T (2010) Secondary metabolite production in callus cultures of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research* 45(3): 243-248. doi: 10.3329/bjsir.v45i3.6532.
- [8] Goncalves S, Romano A (2018) Production of plant secondary metabolites by using biotechnological tool. doi:10.5772/intechopen.76414
- [9] Ashokhan S, Othman R, Rahim MHA, Karsani SA, Yaacob JS (2020) Effect of plant growth regulators on coloured callus formation and accumulation of azadirachtin, an essential biopesticide in

- Azadirachta indica. Plants 9(352): 1-17. doi: 10.3390/plants9030352.
- [10] Benjamin ED, Ishaku GA, Peingurta FA, Afolabi (2019) Callus culture for the production of therapeutic compounds. American Journal of Plant Biology 4(4): 76-84. doi: 10.11648/j.ajpb.20190404.14.
- [11] Efferth T (2019) Biotechnology applications of plant callus cultures. Engineering 5(1):50-59. doi: 10.1016/j.eng .2018.11.006
- [12] Yan MM, Kim CH, Apho BA, Xu C, Um YC, Guo DP (2009) Effects of explant type, culture media and growth regulators on callus induction and plant regeneration of Chinese jiaotou (*Allium chinense*). Scientia Horticulturae 123(1):124-128. doi: 10.1016/j.scienta.2009.07.021.
- [13] Adil M, Ren X, Kang DI, Thi LT, Jeong BR (2018) Effect of explant type and plant growth regulators on callus induction, growth and secondary metabolites production in *Cnidium officinale* Makino. Molecular Biology Reports. 45(6):1919-1927. doi: 10.1007/s11033-018-4340-3.
- [14] Agata K, Kusiak J, Stępień B, Bergier K, Kuźniak E (2010) Bioactive secondary metabolites produced by plants of the genus *Physalis*. Postepy Hig Med Dosw (Online), 64, 665-73.
- [15] Januário AH, Filho ER, Pietro RCLR, Kashima S, Sato DN, França SC (2000) Antimycobacterial physalins from *Physalis angulata* L. (Solanaceae). Phytotherapy Research, 16, 445 – 448. doi:/10.1002/ptr. 939
- [16] Patel T, Shah K, Jiwan K, Shrivastava N (2011) Study on the antibacterial potential of *Physalis minima* Linn. Indian Journal of Pharmaceutical Science, 73(1):111-115. doi: 10.4103/0250-474X.89770
- [17] Khan MA, Khan H, Khan S, Mahmood T, Khan PM, Jabar A (2009) Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of *Physalis minima* Linn. J. Enzyme Inhibition Med. Chem. 24, 632-7. doi: 10.1080/14756360802321120.
- [18] Lin YS, Chiang HC, Kan WS, Hone E, Shih SJ, Won MH (1992) Immunomodulatory activity of, various fractions derived from *Physalis angulata* L. extract. The American Journal of Chinese Medicine. 20(3-4):233–243. doi: 10.1142/S0192415X92000242.
- [19] Mungole AJ, Doifode VD, Kamble RB, Chaturvedi A, Zanwar P (2011) In-vitro callus induction and shoot regeneration in *Physalis minima* L. Annals of Biological Research, 2 (2) : 79-85.
- [20] Sheeba E, Palanivel S, Parvathi S (2013) Effect of plant growth regulators on callus induction in *Physalis minima* Linn. International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology, 2(9):4847 – 4851.
- [21] Ramar, K. and V. Ayyadurai (2016) In vitro callus induction studies of *Physalis minima* (L). An Important Medicinal Plant. International Journal of Pharmaceutical Science and Research 1(1):01-03.
- [22] Lashin II, Elhaw MH (2016) Evaluation of secondary metabolites in callus and tissues of *Physalis peruviana*. International Journal of Modern Botany, 6(1):10-17. doi: 10.5923/j.ijmb.20160601.03
- [23] Mastuti R, Munawarti A, Firdiana ER (2017) The combination effect of auxin and cytokinin on in vitro callus formation of *Physalis angulata* L. – A medicinal plant. AIP Conference Proceeding 1908, 040007. doi:10.1063/1.5012721.
- [24] Bertoncelli MC, dos Passos OAI, Ariati AC, Ortolan AO, Witt EP (2014) Establishment and content of sugars and phenols in *Physalis* callus obtained from different explants and concentrations of BAP and NAA. Acta Scientiarum. Biological Sciences, 36(1): 27-33. doi: 10.4025/actascibiolsci.v36i1.18074
- [25] Bhatia S (2015) Plant tissue culture. In: Bathia S (ed) Modern applications of plant biotechnology in pharmaceutical sciences. Academic Press, Oxford, pp 31-107.
- [26] Murashige T and Skoog F (1962), A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Plant Physiology. 15, 473-497.
- [27] Makunga NP, Jager AK, van Staden J, (2005) An improved system for the in vitro regeneration of *Tapsia garganica* via direct organogenesis – influence of auxins and cytokinins. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 82: 271–280. doi: 10.1007/s11240-005-1372-x.

- [28] George EF, Hall MA, De Klerk GJ (2008) Plant growth regulators I: Introduction; auxins, their analogues and inhibitors. Dalam: George EF, Hall MA, Klerk GJ (eds) Plant Propagation by Tissue Culture 3rd ed, Springer, The Netherlands, pp 175–204.
- [29] Thangavelu RM, Gunasekaran D, Jesse MI, Mohammed Riyaz, D Sundarajan, K Krishnan (2018) Nanobiotechnology approach using plant rooting hormone synthesized silver nanoparticle as “nanobullets” for the dynamic applications in horticulture – An in vitro and ex vitro study. Arabian Journal of Chemistry. 11(1): 48-61. doi:10.1016/j.arabjc.2016.09.022
- [30] K. Satyavani, T. Ramanathan and S. Gurudeeban (2011) Effect of plant growth regulators on callus induction and plantlet regeneration of bitter apple (*Citrullus colocynthis*) from stem explant. Asian Journal of Biotechnology 3(3): 246-253. doi: 10.3923/ajbkr.2011.246.253
- [31] Khanam N, Khoo C, Khan AG (2000) Effects of cytokinin/auxin combination on organogenesis, shoot regeneration and tropane alkaloid production in *Duboisia myoporoides*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 62, 125–33. doi: 10.1023/A:1026568712409.