

Respon Pertumbuhan dan Toleransi Kalus *Talinum paniculatum* terhadap Cekaman Logam Berat Krom (Cr)

RATIH RESTIANI*, SARAH M.P. KABAN, ASTRID A. SEKAR, JOSIAH H. MATHEOS

Program Studi Biologi, Fakultas Bioteknologi, Universitas Kristen Duta Wacana, Yogyakarta, Indonesia

Diterima: 22 Januari 2024 - Disetujui: 28 Maret 2024
© 2024 Jurusan Biologi FMIPA Universitas Cenderawasih

ABSTRACT

The escalating chromium (Cr) heavy metal contamination necessitates effective remediation strategies like phytoremediation. Selecting chromium-tolerant plant species is crucial for successful phytoremediation, achievable through in vitro culture to induce somaclonal variations with resistance traits. *Talinum paniculatum*, an ornamental plant with robust roots and stress resilience, is a promising candidate for chromium tolerance studies. This research assesses *T. paniculatum* callus response to chromium stress, focusing on growth and tolerance indices. Results demonstrate the callus's resilience to increasing Cr concentrations, reflected in biomass increase (0.117–0.150 g) and a high tolerance index (TI) of 77.78–100%. Structural integrity and color remained stable throughout the study period, underscoring *T. paniculatum*'s potential for chromium phytoremediation.

Key words: biomass; callus; Cr; phytoremediation; *Tolerance Index*

PENDAHULUAN

Pencemaran lingkungan yang disebabkan oleh logam berat khususnya kromium (Cr), telah menjadi masalah yang sangat serius secara global selama beberapa dekade terakhir. Hal ini disebabkan karena meningkatnya penggunaan kromium dalam berbagai aktivitas manusia, seperti: pertanian, industri tekstil, penyamakan kulit, dan penambangan. Limbah industri yang tidak diolah dengan tepat dapat menyebabkan residu kromium terbawa aliran air dan mengalir ke dalam tanah. Hal ini dapat mencemari lingkungan, menjadi residu dalam tanaman, masuk ke dalam rantai makanan dan dalam jangka panjang dapat membahayakan kesehatan manusia (Suteja *et al.*, 2020). Salah satu upaya yang

dapat diterapkan untuk mengatasi permasalahan lingkungan ini adalah melalui fitoremediasi.

Fitoremediasi merupakan suatu teknologi pengolahan polutan menjadi bentuk senyawa yang tidak berbahaya menggunakan tanaman. Strategi ini telah banyak diterapkan karena memiliki beberapa kelebihan yaitu ramah lingkungan, efisien dan hemat biaya karena memanfaatkan kemampuan alami tumbuhan untuk memulihkan lingkungan yang tercemar (Muthusaravanan *et al.*, 2018). Meskipun demikian, implementasi fitoremediasi secara praktis di lingkungan tercemar masih belum optimal karena kurangnya informasi mengenai kemampuan internal (metabolisme dan mekanisme toleransi) tumbuhan yang digunakan sebagai agen fitoremediasi (fitoremediator) (Doran, 2009; Hidayati, 2005).

Pemilihan tanaman yang memiliki toleransi tinggi (hiperakumulator) terhadap logam berat merupakan salah satu faktor pendukung keberhasilan implementasi fitoremediasi. Kultur *in vitro* merupakan salah satu strategi yang dapat

* *Alamat korespondensi:*

Program Studi Biologi, Fakultas Bioteknologi, Universitas Kristen Duta Wacana, Jln. Dr Wahidin Sudiro Husodo No. 5-25, Kotabaru, Gondokusuman, Kota Yogyakarta, Indonesia. E-mail: ratih.restiani@staff.ukdw.ac.id

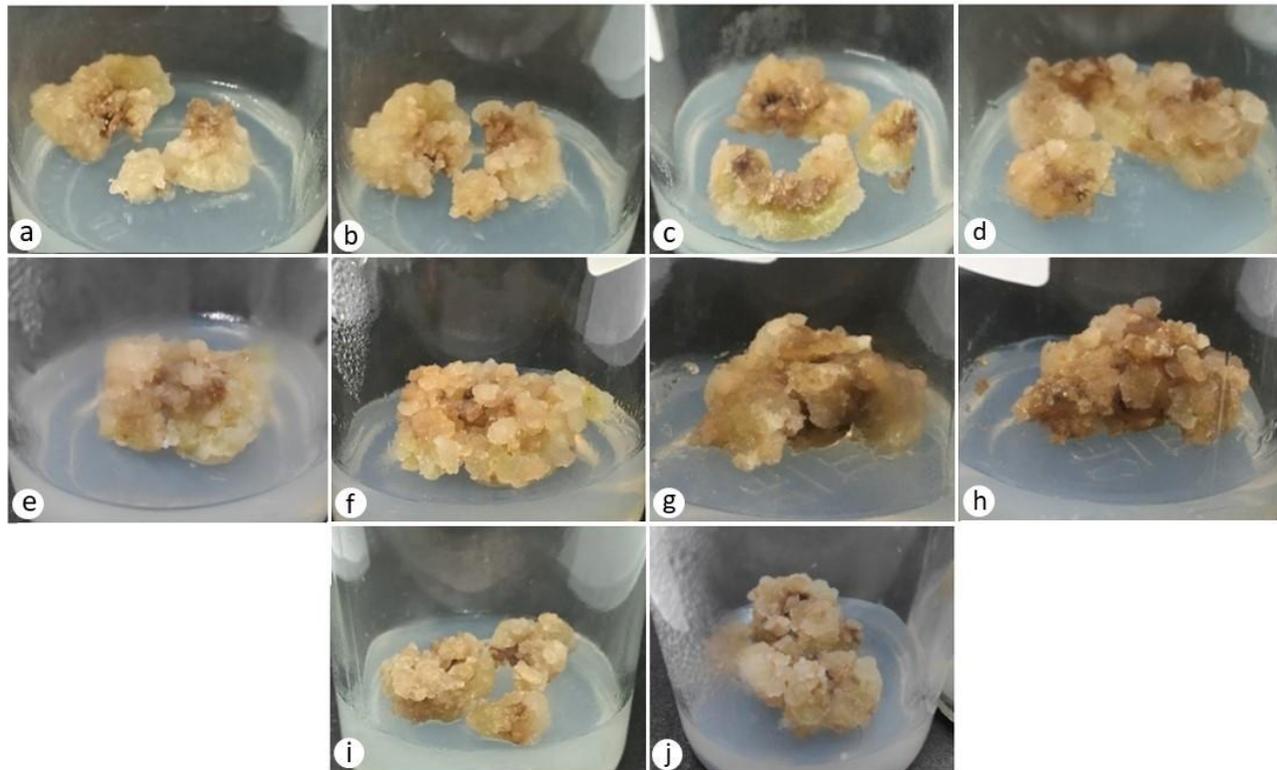
dimanfaatkan dalam mengoptimalkan upaya fitoremediasi tersebut (Doran, 2009; Elazab *et al.*, 2023). Teknik kultur *in vitro* memiliki keunggulan dalam mengoptimalkan seleksi tanaman toleran terhadap logam berat dibandingkan dengan sistem *ex-vitro*.

Hal ini disebabkan karena seleksi tanaman toleran melalui kultur *in vitro* dilakukan secara aseptis (bebas dari simbiosis mikrobial rizosfer atau kontaminan lain). Selain itu, modifikasi konsentrasi logam berat yang ditambahkan dalam kultur *in vitro* memudahkan peneliti memperoleh gambaran mengenai mekanisme internal (metabolisme dan molekuler) dari kultur yang toleran (Doran, 2009; Nurchayati *et al.*, 2016).

Aplikasi kultur *in vitro* dalam bidang fitoremediasi diharapkan dapat mengoptimalkan penggunaan spesies tanaman dengan potensi penyerapan polutan dan toleransi tinggi. Kultur *in*

vitro dapat berkontribusi pada pengembangan pendekatan fitoremediasi baru, lebih efektif, memberikan manfaat secara ekonomi dan ekologi (Liu *et al.*, 2018). Beberapa penelitian berhasil diketahui jenis tanaman yang memiliki kemampuan akumulasi dan toleransi melalui kultur kalus. Nawrot-Chorabik (2017) berhasil meneliti pengaruh beberapa jenis logam berat (Cu, Cd dan Pb) terhadap kalus *Abies nordmanniana* dan menemukan bahwa toksisitas dan toleransi kalus terhadap logam berat dapat diamati dengan cepat dan mudah melalui morfologi (tekstur dan warna) kalus. Dari ketiga jenis logam berat yang diteliti, Pb memberikan efek toksik tertinggi bagi kalus *Abies nordmanniana*.

Tumbuhan *T. paniculatum* (Ginseng Jawa) merupakan salah satu spesies tanaman berbunga anggota keluarga Talinaceae. Selain bermanfaat dalam sebagai tanaman herbal dan tanaman sayur,



Gambar 1. Morfologi kalus *T. paniculatum* dalam media seleksi Cr pada berbagai konsentrasi dan waktu pengamatan 0 dan 10 HST (a-b) kalus pada media kontrol (0 ppm) (c-d) kalus pada media Cr 0,5 ppm (e-f) kalus pada media Cr 1 ppm (g-h) kalus pada media Cr 2 ppm (i-j) kalus pada media Cr 3 ppm.

T. paniculatum dapat dimanfaatkan sebagai tanaman hias (Ernest *et al.*, 2017). Beberapa penelitian telah dilakukan untuk melihat kemampuan tanaman dari genus *Talinum* terhadap remediasi logam berat pada sistem *ex vitro*. Cai *et al.* (2020) melaporkan bahwa *T. paniculatum* memiliki daya akumulasi tinggi dan translokasi logam berat timah yang tergolong kuat ($TF > 1$). Selain itu, Rajkumar *et al.* (2009) juga melaporkan *T. triangulare* dapat mengakumulasi logam berat Pb pada akar dan batang secara signifikan.

Meskipun telah terbukti bahwa genus *Talinum* potensial digunakan sebagai tanaman fitoremediasi, namun belum ada studi mengenai respon pertumbuhan dan toleransi *T. paniculatum* terhadap cekaman logam berat kromium melalui kultur *in vitro*. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian mengenai pengaruh cekaman logam berat krom (Cr) terhadap pertumbuhan dan toleransi kalus *T. paniculatum*. Penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat dalam memberikan gambaran mekanisme internal *T. paniculatum* yang mampu mengakumulasi, mengekstraksi dan toleran terhadap kromium serta berkontribusi dalam meningkatkan signifikansi implementasi fitoremediasi di lingkungan tercemar Cr.

METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April hingga Agustus 2023. Penelitian dilakukan di Laboratorium Bioteknologi Dasar, Fakultas Bioteknologi, Universitas Kristen Duta Wacana Yogyakarta. Analisis logam berat dilakukan di Laboratorium Terpadu Universitas Islam Indonesia (UII), Yogyakarta. Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan perlakuan kromium (Cr). Penelitian dilakukan dengan 5 perlakuan konsentrasi yaitu: 0, 0,5, 1, 2, dan 3 ppm terhadap pertumbuhan dan toleransi kalus *T. paniculatum*. Setiap perlakuan dilakukan tiga kali pengulangan.

Induksi Kalus

Induksi kalus dilakukan berdasarkan metode Restiani *et al.* (2022). Kalus diinduksi dari eksplan daun *T. paniculatum* muda yang diambil pada urutan 2 - 3 dari pucuk tanaman. Eksplan daun diambil dari tanaman induk yang sehat, tidak layu dan bebas penyakit. Eksplan daun dicuci menggunakan air mengalir, direndam dalam campuran deterjen cair dan Tween 80 sebanyak tiga tetes lalu dibilas dengan akuades steril dilanjutkan sterilisasi dalam *Laminar Air Flow* (LAF). Eksplan direndam dalam alkohol 70% selama tiga menit sambil digojog perlahan dan dibilas menggunakan akuades steril sebanyak tiga kali. Eksplan daun steril dipotong berukuran 1 cm² melewati tulang daun selanjutnya diinokulasi dalam media Murashige and Skoog (MS) (Murashige & Skoog, 1962) dengan penambahan hormon 2,4-D 2 mg/L (auksin) dan kinetin 3 mg/L (sitokinin). Kultur diinkubasi pada suhu 20-24 °C dengan kondisi 24 jam terang dan intensitas cahaya 600-1000 lux menggunakan lampu fluorescent (TL).

Perlakuan Logam Berat Krom (Cr)

Perlakuan kalus dalam media logam berat mengacu pada Nurchayati *et al.* (2016) dengan modifikasi. Kalus yang telah dikulturkan selama 30 hari selanjutnya disubkultur ke dalam medium MS yang mengandung kombinasi hormon 2,4-D 2 mg/L (auksin), kinetin 3 mg/L (sitokinin) dan logam berat CrO₃ pada berbagai konsentrasi yaitu: 0, 0,5, 1, 2 dan 3 ppm selama 10 hari. Kultur disimpan pada suhu 20-24 °C dengan kondisi 24 jam terang dan intensitas cahaya 600-1000 lux menggunakan lampu fluorescent (TL).

Morfologi dan Pertumbuhan Kalus

Salah satu parameter yang dapat digunakan untuk mengamati toleransi kalus terhadap cekaman logam berat Cr adalah parameter pertumbuhan (biomassa) dan morfologi kalus. Pertumbuhan diukur melalui penimbangan berat kering kalus pada hari ke-0 dan hari ke-10 (setelah sub-kultur dalam media Cr). Pengukuran terhadap berat kering dilakukan dengan mengeringkan kalus di dalam oven pada suhu 40

°C sampai diperoleh berat kering sampel yang stabil lalu dilakukan penimbangan. Selain itu, pengaruh cekaman Cr terhadap kalus juga diamati berdasarkan morfologi (tekstur dan warna) kalus. Tekstur kalus terdiri dari kompak, remah, dan nodular. Selain itu warna kalus terdiri dari kuning, hijau, cokelat, putih, dan kuning kehijauan (Nawrot-Chorabik, 2017).

Indeks Toleransi (IT)

Perhitungan indeks toleransi (IT) bertujuan untuk mengetahui kemampuan kalus *T. paniculatum* dalam mentoleransi logam berat kromium. Nilai IT menjadi salah satu indikator penentu suatu tanaman merupakan hiperakumulator terhadap logam berat atau tidak (Ismail *et al.*, 2020). Pengukuran IT mengacu pada metode Bernabé-Antonio *et al.* (2015) menggunakan berat kering kalus. IT dihitung berdasarkan rasio berat kering kalus pada media mengandung Cr terhadap berat kering kalus pada media kontrol (tanpa Cr) dinyatakan dalam persentase (%).

Analisis Data

Data morfologi kalus dianalisis secara deskriptif, selanjutnya biomassa dan indeks toleransi (IT) dianalisis secara statistik menggunakan program IBM SPSS Statistics V21 x86 dengan uji ANOVA pada taraf signifikansi 5%. Jika terdapat perbedaan signifikan, maka dilanjutkan dengan *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh Cekaman Logam Berat Cr terhadap Morfologi Kalus

Pada penelitian ini, kalus *T. paniculatum* yang dipanen dari tahap proliferasi selama 30 hari menunjukkan tekstur remah (*friable*) berwarna putih kekuningan (Gambar 1a). Tekstur dan warna kalus menunjukkan kualitas kalus untuk dikembangkan dalam penelitian selanjutnya. Berdasarkan Restiani *et al.* (2022), kalus remah (*friable*) potensial untuk diregenerasikan

membentuk tunas dan akar dibandingkan kalus dengan tekstur kompak. Penambahan kombinasi hormon 2,4-D dan kinetin secara eksogen ke dalam media MS mempengaruhi struktur dinding sel kalus yang terbentuk, dimana kalus remah belum mengalami lignifikasi dibandingkan kalus kompak. Berdasarkan tekstur dan warna kalus yang diperoleh dalam penelitian ini, kualitas kalus potensial digunakan dalam seleksi kalus yang toleran terhadap Cr pada berbagai konsentrasi.

Kalus hasil seleksi dalam media mengandung larutan krom pada berbagai konsentrasi (0, 0,5, 1, 2 dan 3 ppm) menunjukkan tidak adanya perubahan warna dan tekstur kalus jika dibandingkan dari 0 dan 10 Hari Setelah Tanam (HST) (Gambar 1 a-f, i-j), meskipun pada kalus yang dikulturkan dalam media mengandung Cr konsentrasi 2 ppm menunjukkan sedikit perubahan intensitas warna kecokelatan setelah diinkubasi selama 10 hari (Gambar 1g-h). Hal ini mengindikasikan bahwa level konsentrasi krom (0, 0,5, 1, 2 dan 3 ppm) belum menyebabkan toksisitas bagi kalus *T. paniculatum* sehingga kalus masih dapat melangsungkan pertumbuhan. Hasil penelitian ini sejalan dengan Palengara (2020) yang melaporkan bahwa peningkatan konsentrasi $PbCl_2$ dalam media MS (0-150 mM) belum menyebabkan toksisitas pada kalus *Solanum lycopersicum* setelah 49 hari inkubasi ditunjukkan oleh peningkatan biomassa kalus yang dihasilkan. Selain itu, Nurchayati *et al.* (2016) juga melaporkan bahwa peningkatan konsentrasi logam berat Cu dalam media MS tidak mempengaruhi perubahan warna dan tekstur kalus tanaman *Datura metel*. Hal ini mengindikasikan bahwa kalus *D. metel* memiliki tingkat akumulasi dan IT yang tinggi terhadap Cu. Namun hasil penelitian berbanding terbalik dengan Nawrot-Chorabik (2017) yang melaporkan bahwa peningkatan konsentrasi logam Cd dan Pb (20 mg/L) dalam media MS menyebabkan perubahan tekstur kalus menjadi kompak dan berwarna hitam, selanjutnya menyebabkan kematian kalus *Abies nordmanniana*.

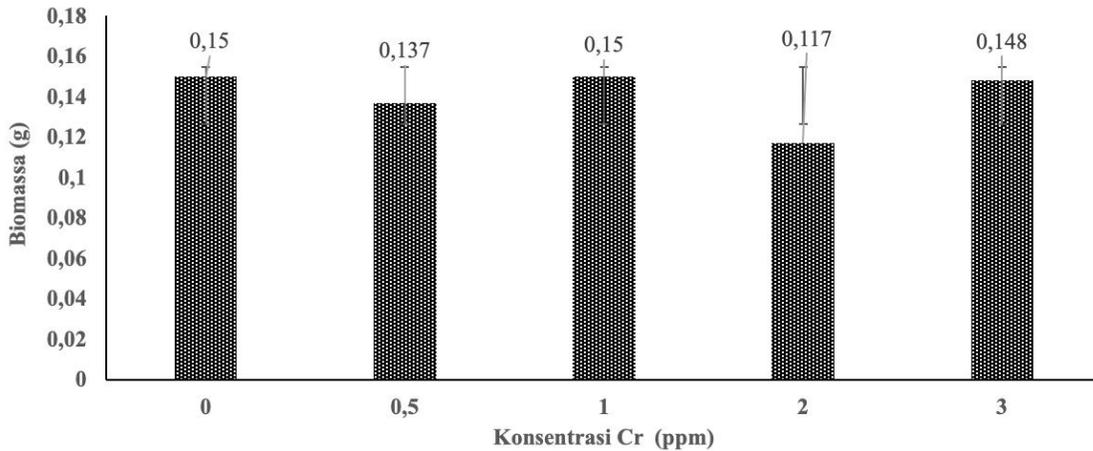
Menurut Rasud & Bustaman (2020), perubahan warna kalus dapat menggambarkan kondisi pertumbuhan sel penyusunnya. Kalus berwarna putih menunjukkan bahwa sel-selnya

masih aktif melakukan pembelahan. Perubahan warna kalus menjadi putih kekuningan menunjukkan bahwa sel-sel penyusun kalus sudah memasuki masa pendewasaan. Selanjutnya, perubahan warna menjadi cokelat menunjukkan bahwa kalus sudah memasuki masa penuaan sel. Selain itu, warna kalus menjadi kecokelatan dapat disebabkan karena akumulasi senyawa fenolik dalam kalus sebagai produk metabolisme sekunder dari sel yang memasuki fase stasioner, dan kalus mengalami keracunan akibat akumulasi logam berat dalam penelitian tersebut yaitu

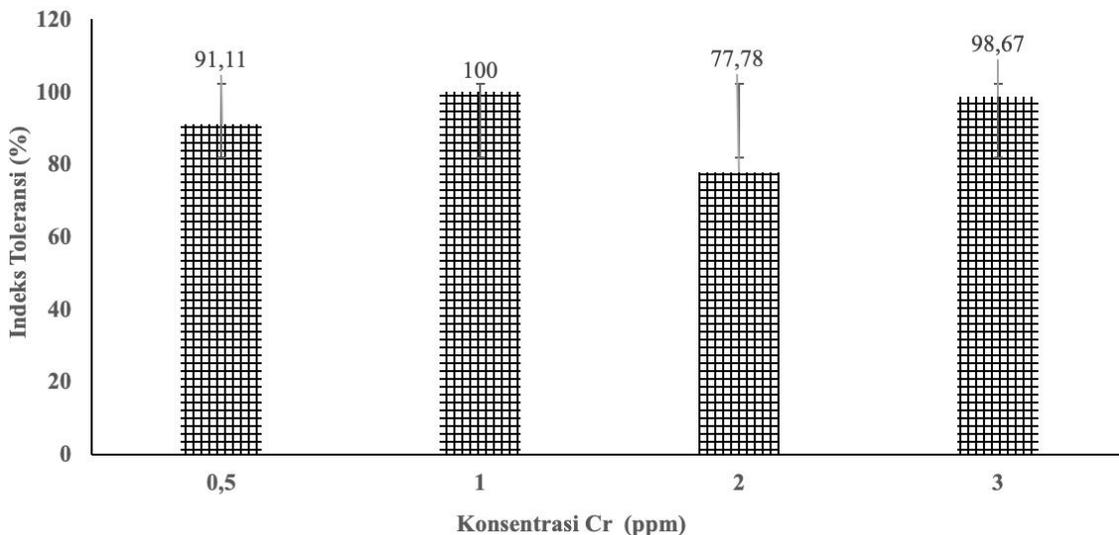
senyawa krom.

Pengaruh Cekaman Logam Berat Cr terhadap Pertumbuhan dan Indeks Toleransi (IT) Kalus

Pengukuran biomassa berupa berat kering kalus pada media seleksi logam berat bertujuan untuk melihat pengaruh efek toksisitas Cr terhadap pertumbuhan kalus. Berdasarkan hasil pada Gambar 2, biomassa kalus *T. paniculatum* dari perlakuan Cr berbagai konsentrasi menunjukkan kecenderungan menurun seiring dengan peningkatan konsentrasi Cr dalam media.



Gambar 2. Biomassa kalus *T. paniculatum* pada media MS dan berbagai konsentrasi Cr.



Gambar 3. Indeks Toleransi (IT) kalus *T. paniculatum* pada berbagai konsentrasi Cr.

Meskipun berdasarkan berat kering pada kontrol lebih besar (0,15 g) dibandingkan pada perlakuan Cr berbagai konsentrasi (0,117-0,150 g) namun hasil analisis statistik ANOVA menunjukkan bahwa perlakuan Cr pada berbagai konsentrasi tidak menunjukkan perbedaan signifikan ($p > 0.05$) dengan nilai signifikansi 0,072. Hasil ini mengindikasikan bahwa konsentrasi Cr sebesar 0,5 - 3 ppm masih dapat ditoleransi oleh kalus *T. paniculatum*. Tidak ada dampak bagi penghambatan pertumbuhan maupun kematian kalus *T. paniculatum* yang telah diinkubasi dalam media mengandung Cr selama 10 hari.

Nurchayati *et al.* (2016) menunjukkan hasil penelitian terjadi peningkatan konsentrasi Cu^{2+} sampai konsentrasi tertinggi (5 mg/L) setelah 10 hari inkubasi tidak berdampak pada kematian sel kalus *Datura metel*. Hasil yang sama juga dilaporkan oleh Palengara (2020) bahwa kalus *Solanum lycopersicum* mengalami peningkatan biomassa seiring dengan peningkatan konsentrasi PbCl_2 (50 - 150 mM) dan HgCl_2 (50-200 mM) dalam media kultur selama 49 hari inkubasi. Selain itu, Bernabé-Antonio *et al.* (2015) juga melaporkan bahwa kultur suspensi sel *Jatropha curcas* mengalami peningkatan biomassa seiring dengan peningkatan konsentrasi logam berat Pb (0-3 mM), sedangkan pada peningkatan konsentrasi Cr (0-1 mM) kultur sel *J. curcas* mulai mengalami penurunan biomassa karena sel sudah mengalami keracunan akibat akumulasi ion Cr yang tinggi. Perbedaan respon pertumbuhan beberapa kalus pada peningkatan konsentrasi logam berat dalam media kultur *in vitro* dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor di antaranya jenis dan konsentrasi logam berat, jenis dan genotipe tanaman dan jenis kultur (Doran, 2009; Jaskulak & Grobelak, 2017).

Beberapa hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kultur kalus dapat digunakan dalam strategi fitoremediasi untuk mengoptimalkan identifikasi potensi tanaman toleran logam berat secara terkontrol (kondisi *in vitro*) tanpa interaksi dengan faktor lingkungan dan mikrobial. Identifikasi terhadap potensi tanaman toleran logam berat ini didasarkan oleh kemampuan internal tanaman melalui kalus dalam mentoleransi efek toksisitas logam berat.

Selain pengukuran terhadap biomassa, seleksi tanaman toleran logam berat juga diukur berdasarkan nilai indeks toleransi (IT). Gambar 3. menunjukkan bahwa kalus *T. paniculatum* memiliki indeks toleransi sebesar 77,78-100% pada konsentrasi Cr dalam media sebesar 0-3 ppm. Hasil ini mengindikasikan bahwa kalus *T. paniculatum* bersifat toleran terhadap peningkatan ion Cr dan potensial dijadikan bioakumulator. Tanaman toleran adalah tanaman yang mampu beradaptasi (bertahan hidup) pada kondisi konsentrasi logam berat yang tinggi. Kemampuannya dalam bertahan hidup dapat disebabkan karena ion logam berat diubah menjadi bentuk ion non toksik karena diikat oleh protein *phytochellatin* analog *metallothionin*. Protein ini dapat mengikat ion logam berat toksik menjadi non-toksik dan menyimpannya dalam vakuola, sehingga peningkatan konsentrasi logam berat tidak berdampak pada penghambatan pertumbuhan sel-sel kalus atau tanaman (Nurchayati *et al.*, 2016). Nilai IT yang dihasilkan oleh kalus *T. paniculatum* dalam penelitian ini sejalan dengan nilai IT (104,7-136%) yang dihasilkan oleh kalus *J. curcas* dalam media seleksi Pb (0-3 mM) (Bernabé-Antonio *et al.*, 2015). Peningkatan indeks toleransi kalus *T. paniculatum* dan *J. curcas* pada kondisi konsentrasi logam berat yang tinggi ini sangat mungkin disebabkan juga oleh pengaruh logam berat dalam meningkatkan biomassa, indeks toleransi dan metabolit sekundernya (Niranjana *et al.*, 2014; Hayat *et al.*, 2021).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa kalus *Talinum paniculatum* bersifat toleran terhadap cekaman Cr (0-3 ppm). Toleransi kalus ditunjukkan melalui tidak adanya perubahan tekstur (kalus remah) dan warna kalus (putih kekuningan), peningkatan biomassa (0,117-0,150 g) dan indeks toleransi (IT) sebesar 77,78-100% seiring dengan peningkatan konsentrasi Cr (0-3 ppm) dalam media MS. Biomassa dan IT tertinggi kalus *T. paniculatum* dihasilkan pada

media MS dengan konsentrasi Cr sebesar 1 ppm. Hasil penelitian ini bermanfaat dalam memberikan gambaran mekanisme internal *T. paniculatum* yang toleran terhadap kromium serta berkontribusi dalam meningkatkan signifikansi implementasi fitoremediasi di lingkungan tercemar Cr.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada Program Studi Biologi, Fakultas Bioteknologi Universitas Kristen Duta Wacana, Yogyakarta yang telah mendukung dalam pendanaan penelitian dengan Nomor Kontrak: 129/D.01/Bio/2023.

DAFTAR PUSTAKA

- Bernabé-Antonio, A., L. Álvarez, L. Buendía-González, A. Maldonado-Magaña, and F. Cruz-Sosa. (2015a). Accumulation and tolerance of Cr and Pb using a cell suspension culture system of *Jatropha curcas*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 120(1): 221-228. <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0597-y>
- Cai, X., X. Yu, L. Lei, B. Xuan, J. Wang, L. Zhang, and S. Zhao. 2020. Comparison of lead tolerance and accumulation characteristics of fourteen herbaceous plants. *Nature Environment and Pollution Technology*. 19(4): 1547-1555. <https://doi.org/10.46488/NEPT.2020.v19i04.021>.
- Doran, P.M. 2009. Application of plant tissue cultures in phytoremediation research: Incentives and limitations. *Biotechnology and Bioengineering*. 103(1): 60-76. <https://doi.org/10.1002/bit.22280>.
- Elazab, D., M. Lambardi, and M. Capuana. 2023. In vitro culture studies for the mitigation of heavy metal stress in plants. *Plants*. 12(19): 1-19. <https://doi.org/10.3390/plants12193387>.
- Ernest, A., C.C. Anadi, N.-A. Paul, and N. Matthew. 2017. Use of waterleaf (*Talinum triangulare*) in remediation of soil exposed to heavy metals: A green technology approach. *World Journal of Pharmaceutical and Life Sciences*. 3(9): 48-53.
- Hayat, K., A. Khan, F. Bibi, Salahuddin, W. Murad, Y. Fu, G. E.S. Batiha, M. Alqarni, A. Khan, and A. Al-Harrasi. 2021. Effect of cadmium and copper exposure on growth, physio-chemicals and medicinal properties of *Cajanus cajan* L. (pigeon pea). *Metabolites*. 11(11): 1-18. <https://doi.org/10.3390/metabo11110769>.
- Hidayati, N. 2005. Fitoremediasi dan potensi tumbuhan hiperakumulator. *Hayati Journal of Biosciences*. 12(1): 35-40. [https://doi.org/10.1016/S1978-3019\(16\)30321-7](https://doi.org/10.1016/S1978-3019(16)30321-7).
- Ismail, I., R. Mangesa, and I. Irsan. 2020. Bioakumulasi logam berat merkuri (Hg) pada mangrove jenis *Rhizophora mucronata* di Teluk Kayeli Kabupaten Buru. *Biosel: Biology Science and Education*. 9(2): 139. <https://doi.org/10.33477/bs.v9i2.1637>.
- Jaskulak, M., and A. Grobelak. 2017. Potential applications of plant in vitro cultures in phytoremediation studies. *Challenges of Modern Technology*. 8(2): 11-17. <https://doi.org/10.5604/01.3001.0012.2613>.
- Liu, J., X. Xin, and Q. Zhou. 2018. Phytoremediation of contaminated soils using ornamental plants. *Environmental Reviews*. 26(1): 43-54. <https://doi.org/10.1139/er-2017-0022>.
- Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15(3): 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>.
- Muthusaravanan, S., N. Sivarajasekar, J.S. Vivek, T. Paramasivan, M. Naushad, J. Prakashmaran, V. Gayathri, and O.K. Al-Duaij. 2018. Phytoremediation of heavy metals: Mechanisms, methods and enhancements. *Environmental Chemistry Letters*. 16(4): 1339-1359. <https://doi.org/10.1007/s10311-018-0762-3>.
- Nawrot-Chorabik, K. 2017. Response of the callus cells of fir (*Abies nordmanniana*) to in vitro heavy metal stress. *Folia Forestalia Polonica. Series A*. 59(1): 25-33. <https://doi.org/10.1515/ffp-2017-0003>.
- Niranjana, H., M.E. Lee, and K. Paek. 2014. Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: Strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 118: 1-16. <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0467-7>.
- Nurchayati, Y., S. Santosa, L.H. Nugroho, and A. Indrianto. 2016. Growth pattern and copper accumulation in callus of *Datura metel*. *Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education*. 8(2): 135. <https://doi.org/10.15294/biosaintifika.v8i2.5177>.
- Palengara, D. 2020. In vitro studies on heavy metal stress tolerance in *Solanum lycopersicum* L. var. *anagha*. *International Journal of Research and Analytical Reviews*. 6(1): 583-591.
- Rajkumar, K., S. Sivakumar, P. Senthilkumar, D. Prabha, C.V. Subbhuraam, and Y.C. Song. 2009. Effects of selected heavy metals (Pb, Cu, Ni, and Cd) in the aquatic medium on the restoration potential and accumulation in the stem cuttings of the terrestrial plant *Talinum triangulare* Linn. *Ecotoxicology*. 18(7): 952-960. <https://doi.org/10.1007/s10646-009-0371-9>.
- Rasud, Y., and B. Bustaman. 2020. In vitro callus induction from clove (*Syzygium aromaticum* L.) leaves on medium containing various auxin concentrations. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*. 25(1): 67-72. <https://doi.org/10.18343/jipi.25.1.67>.
- Restiani, R., A.C. Dolonseda, S.M.P. Kaban, C.T. Hutabarat, A.A. Sekar, F.A. Meliana, M. Linardi, N. Verrell, and A.A.B. Ky. 2022. Efficient callus and shoot induction

protocol from leaf and node explants of Javanese ginseng (*Talinum paniculatum* (Jacq.) Gaertn.). *Scholars Journal of Agriculture and Veterinary Sciences*. 9(12): 223-231. <https://doi.org/10.36347/sjavs.2022.v09i12.003>.

Suteja, Y., I.G.N.P. Dirgayusa, and A.I.S. Purwiyanto. 2020. Chromium in Benoa Bay, Bali - Indonesia. *Marine Pollution Bulletin*. 153: 111017. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111017>.